



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA NEUROSENSORIALE
XXII CICLO**

**SINTESI, CARATTERIZZAZIONE E STUDIO ELETTROFISIOLOGICO IN
UN MODELLO SPERIMENTALE DI EPILESSIA DI NUOVI DERIVATI
DELL'ACIDO VALPROICO
SSDBIO/09**

**Tesi di Dottorato della
Dott.ssa Simonetta Friscia**

**Coordinatore:
Ch.mo Prof. Giuseppe Ferraro**

**Tutor:
Ch.mo Prof. Pierangelo Sardo**

**Co-Tutor:
Ch.ma Dott.ssa Viviana De Caro (Chim 09)**

Triennio 2008-2010

INTRODUZIONE

Alcune delle tematiche prioritarie nel campo della ricerca scientifica derivano dall'esigenza di intervenire in modo più efficace, mediante nuove strategie, sul controllo delle molteplici patologie che interessano il Sistema Nervoso Centrale (CNS), tra le quali l'epilessia.

Da studi epidemiologici risulta che, nel mondo, circa 50 milioni di persone sono affette da epilessia e che tale patologia si manifesta, nelle sue forme più gravi, a carico di bambini ed anziani (Kandel et al. 2007).

Come fu osservato nel 1980 da John Hughlings Jackson e, successivamente, confermato da studi microfisiologici più recenti, la patologia parossistica è una condizione neurologica cronica nella quale alcune popolazioni di neuroni generano una scarica (burst) di potenziali d'azione ad alta frequenza, multipli e ripetitivi (Avanzini et al. 1993; Löscher, 1999; Tasso et al. 2004; Kandel et al. 2007).

Tale fenomeno elettrico di brusca depolarizzazione della membrana cellulare, associato a una scarica di potenziali d'azione multipli, fu denominato *paroxysmal depolarizing shift* (PDS) da Matsumoto e Ajmone Marsan, o *depolarizing shift* (DS) da Prince (Canger, 1999).

Tuttavia, è noto che comportamenti elettrofisiologici sovrapponibili a quelli definiti come PDS, o DS, possono occasionalmente manifestarsi anche in condizioni normali, a livello dell'area 3 del Corno di Ammone (CA3) e a livello dello strato V della neocorteccia. Sembra dunque più corretto, come osservato da Prince, attribuire i termini PDS (o DS) esclusivamente a quelle scariche in burst che si verificano in condizioni di attivazione sincrona epilettiforme di aggregati neuronali, in seguito a esposizione ad agenti capaci di indurre crisi epilettiche o nel contesto di epilessie spontanee animali.

Il PDS si distingue dalla scarica fisiologica in burst, per la lunga durata, l'elevata frequenza interna di scarica e la tendenza a manifestarsi in modo sincrono su popolazioni più o meno ampie di neuroni, che costituiscono l'aggregato neuronale epilettico (Canger, 1999).

La sede in cui è localizzata la popolazione di neuroni interessata da tale fenomeno e dalla quale origina la scarica epilettica costituisce il focolaio epilettico (Goodman and Gilman, 2008; The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1996).

L'incremento di eccitabilità può dipendere da fattori molto diversi quali, ad esempio, alterazioni delle proprietà cellulari o alterazioni a carico delle connessioni sinaptiche provocate da cicatrici locali, coaguli ematici o tumori (Kandel et al. 2007).

1. Meccanismi fisiopatologici dell'epilessia

Un importante avanzamento nella comprensione dei meccanismi sottesi all'epilessia si è ottenuto con l'introduzione, nella pratica sperimentale, delle tecniche di registrazione *in vitro* da sezioni sottili di tessuto nervoso, mantenute in condizioni di vitalità.

Tali preparati offrono condizioni sperimentali vantaggiose rispetto ai più tradizionali modelli *in vivo*, sia per quanto riguarda la somministrazione locale di sostanze neuroattive o la manipolazione dell'ambiente ionico, sia per quanto riguarda l'analisi delle proprietà neuronali e delle modificazioni indotte dalle procedure sperimentali durante registrazioni stabili e di lunga durata (Avanzini et al. 1999).

Indubbiamente, alla base di ogni fenomeno epilettico è presente un disturbo, costituzionale o acquisito, dell'eccitabilità neuronale.

Le alterazioni neurofisiologiche più comuni possono essere attribuite a svariate anomalie biochimiche, quali: deficit a carico del trasporto ionico, anomalie dei canali ionici voltaggio-dipendenti, deficit a carico della neurotrasmissione inibitoria gabaergica o, in caso contrario, incremento della trasmissione eccitatoria glutamatergica. Tutti i fattori elencati si traducono

nell'alterazione delle proprietà di membrana delle cellule neuronali (Avanzini e Franceschetti, 2003; Avanzini et al. 1999).

In condizioni fisiologiche, il trasferimento ionico a livello delle membrane avviene mediante molteplici sistemi di trasporto, sia di tipo attivo (pompe ioniche), sia di tipo diffusivo, attraverso canali ionici attivati chimicamente (ad es. legame neurotrasmettitore-recettore) o da variazioni del livello di polarizzazione della membrana (correnti voltaggio-dipendenti).

Tra le pompe ioniche, oltre alla nota Na^+/K^+ ATPasi, deputata al trasporto di Na^+ e di K^+ (rispettivamente verso l'esterno e verso l'interno della cellula), sono presenti altri sistemi di trasporto attivo che regolano l'omeostasi cellulare. In particolare, due pompe ioniche sono responsabili della fuoriuscita di Ca^{+2} dal compartimento intracellulare: un sistema legato a una Ca-ATPasi calmodulino-dipendente e una pompa $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ reversibile.

Un'alterazione, o un eventuale blocco, del trasporto attivo di membrana induce un incremento della concentrazione di Na^+ e Ca^{+2} nell'ambiente intracellulare, determinando, in tal modo, la depolarizzazione della membrana. Tale depolarizzazione viene ulteriormente intensificata dal concomitante incremento della concentrazione di K^+ a livello extracellulare, con conseguente riduzione del gradiente di concentrazione transmembranario di tale ione, dovuto a un deficit di funzionamento dell'ATPasi di membrana delle cellule gliali (Canger, 1999).

L'insieme di questi meccanismi è alla base degli episodi epilettici che si manifestano a seguito di una riduzione di apporto energetico al CNS, ad esempio, durante anossia o ipoglicemia.

I canali voltaggio-dipendenti per il Na^+ regolano il flusso del catione attraverso la membrana plasmatica delle cellule neuronali; l'apertura di tali canali, in seguito ad uno stimolo eccitatorio, determina l'ingresso dello ione nella cellula. Un incremento dei livelli intracellulari di Na^+ , contribuisce al raggiungimento del potenziale d'azione che, a sua volta, comporta l'ingresso di Ca^{+2} nella cellula (mediato dall'apertura dei canali voltaggio-dipendenti) e il rilascio di neurotrasmettitori dal terminale presinaptico.

I canali voltaggio-dipendenti per lo ione K^+ sono, invece, responsabili dello spegnimento del segnale eccitatorio: l'efflusso di questi ioni dalla cellula neuronale determina la ripolarizzazione della membrana cellulare, ripristinando il potenziale di riposo e spegnendo la cascata di eventi originatasi a causa dello stimolo eccitatorio.

Il glutammato, principale neurotrasmettitore eccitatorio del CNS, riconosce e lega due tipologie di recettori: ionotropici e metabotropici. Questi ultimi fungono da modulatori della sinapsi glutammatergica, in quanto reclutati solo in condizioni di elevate concentrazioni extracellulari del neurotrasmettitore.

Tra i recettori ionotropici si distinguono due tipologie, a seconda se legano o meno il ligando N-metil-D-aspartato: recettori non-NMDA (AMPA e Kainato), permeabili solo al Na^+ e al K^+ , e recettori NMDA, permeabili anche al Ca^{+2} , oltre che al Na^+ e al K^+ . I recettori ionotropici del glutammato, con particolare riferimento agli NMDA, sono responsabili della trasmissione sinaptica eccitatoria. Il recettore del NMDA, è inattivo durante il potenziale di riposo e può subire una duplice attivazione: mediante il legame con Glu (attivazione chimica) o a seguito di una depolarizzazione rispetto al potenziale di riposo (attivazione voltaggio-dipendente). Da quanto detto, è evidente la possibilità di sommazione fra effetto chimico del Glu, che induce una depolarizzazione della membrana post-sinaptica, ed effetto voltaggio-dipendente che, a causa di tale depolarizzazione, attiva il recettore NMDA. L'effetto finale di tale doppia attivazione è una depolarizzazione particolarmente intensa (anche perché il canale accoppiato al recettore NMDA è permeabile anche al Ca^{+2} oltre che al Na^+) e una prolungata scarica in burst (Canger, 1999).

L'acido γ -ammino-butyrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore inibitorio del CNS. Studi in vitro hanno dimostrato che esso viene rilasciato dalle vescicole, tanto spontaneamente, che in seguito a stimolazione nervosa. La liberazione del GABA indotta da depolarizzazione, a differenza di quella spontanea, è Ca^{+2} -dipendente.

Il neurotrasmettitore lega differenti recettori denominati $GABA_A$, $GABA_B$ e $GABA_C$ (quest'ultimo espresso solo a livello della retina), che differiscono tra loro per profilo

farmacologico, struttura molecolare e meccanismo di trasduzione del segnale. I recettori GABA_A e GABA_C sono recettori-canale permeabili allo ione Cl⁻ e la loro attivazione riduce l'eccitabilità, mentre i recettori GABA_B sono accoppiati a proteine G inibitorie. I primi sono caratterizzati da un'elevata sensibilità alla bicucullina e al muscimolo, rispettivamente antagonista selettivo e agonista selettivo ad alta affinità per il sito di legame del GABA, e contengono siti specifici di legame per le benzodiazepine ed i barbiturici, che ne modulano la funzione. I recettori GABA_B, invece, sono attivati selettivamente dal derivato del GABA, β-p-clorofenil-GABA (baclofen). L'interazione del GABA o del baclofen con i recettori GABA_B attiva principalmente una proteina G specifica a carattere inibitorio (Gi), che produce un'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi. La conseguente riduzione della concentrazione di cAMP si traduce in una riduzione dei livelli di fosforilazione ed inibizione funzionale dei canali voltaggio-dipendenti del Ca⁺², implicati nel controllo presinaptico del rilascio di neurotrasmettitori (Avanzini et al. 1993; Kwan et al. 2001; Clementi and Fumagalli, 2000).

Alla luce di quanto detto, è evidente che alterazioni a carico della trasmissione sinaptica (chimica) possono indurre ipereccitabilità, tradotta in scariche di burst, in conseguenza di uno sbilanciamento tra azione inibitoria (mediata prevalentemente dal GABA) e azione eccitatoria (mediata prevalentemente dal Glu).

2. Farmacoterapia dell'epilessia

La farmacoterapia dell'epilessia prevede l'impiego di farmaci antiepilettici (AEDs) che, con diversi meccanismi d'azione, stabilizzano le proprietà elettriche della membrana delle cellule nervose, riducendo e/o impedendo l'insorgere di scariche elettriche spontanee, caratteristiche della patologia. Si tratta, quindi, di una terapia sintomatica che, nonostante non elimini la causa dell'epilessia, riesce, tuttavia, a garantire una discreta qualità di vita a molti pazienti.

Attualmente sono numerosi i farmaci che vengono impiegati nel trattamento dell'epilessia, in monoterapia o in combinazione tra loro.

Gli AEDs vengono classificati in base al meccanismo d'azione mediante il quale esplicano l'effetto farmacologico e, in particolare, si conoscono farmaci che agiscono:

- modulando l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti per gli ioni Na^+ , K^+ , Ca^{+2} e influenzando il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori, quali il Glu (es. fenitoina, carbamazepina, lamotrigina);
- potenziando la neurotrasmissione gabaergica, innalzando dunque i livelli di GABA, principale neurotrasmettitore inibitorio del CNS (es. benzodiazepine, fenobarbital, vigabatrin, gabapentin, tiagabina);
- mediante una combinazione dei due precedenti meccanismi esposti, e quindi, da un canto, regolando i flussi ionici attraverso la modulazione dei canali voltaggio-dipendenti e, dall'altro, incrementando i livelli di GABA (es. acido valproico, felbamato, topiramato) (Fauci et al. 1998; Willoughby, 2000; Kwan et al. 2001).

Nonostante una risposta completa alla terapia medica sia prevedibile circa nel 70% dei pazienti, la maggior parte dei farmaci disponibili risulta ancora inefficace nel controllo delle crisi epilettiche nel rimanente 30% (Bialer and Yagen, 2007). Tuttavia, anche per i pazienti che rispondono alla terapia, le problematiche associate all'assunzione degli AEDs sono molteplici:

- necessità di somministrazioni giornaliere frequenti;
- trattamenti prolungati nel tempo (terapia cronica) (Bialer and Yagen, 2007; Shimshoni et al. 2008);
- elevata incidenza di effetti collaterali dose-dipendenti (disturbi cognitivi e del linguaggio, atassia, epatotossicità, teratogenicità, discrasie ematiche, rash cutanei ecc.).

Inoltre, un ulteriore fattore limitante è legato alla difficoltà con la quale gli AEDs raggiungono il CNS, a causa: delle caratteristiche chimico-fisiche dei farmaci, dell'azione disattivante

esercitata dagli enzimi presenti sia a livello plasmatico che delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali e delle caratteristiche morfologiche della BBB (Wu et al. 2010; Tasso et al. 2004).

3. Acido Valproico

Tra i farmaci tradizionalmente impiegati nel trattamento dell'epilessia, l'acido valproico (VPA) è uno tra i maggiormente prescritti (Sobol et al. 2006). La sua attività anticonvulsivante fu scoperta, per caso, da Pierre Eymard nel 1962 e, da allora, esso è stato largamente impiegato in tutto il mondo per il trattamento di numerosi tipi di epilessie, risultando particolarmente efficace sia in pazienti adulti che nei bambini, tanto nel controllo di accessi parziali che di accessi generalizzati (Löscher, 2002).

Il VPA possiede una struttura chimica piuttosto semplice; si tratta, infatti, di un acido grasso con una catena ramificata corta, costituita da 8 atomi di carbonio (Fig.1).

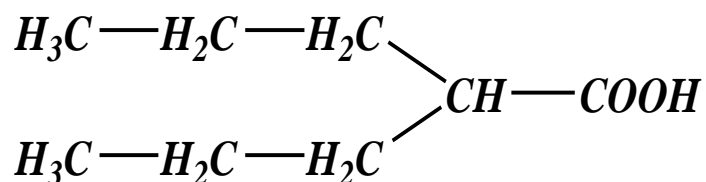


Fig. 1. Struttura chimica del VPA

Il VPA viene usualmente impiegato come Valproato di sodio (Depakin[®]) o come dimero (Divalproex[®], Depakote[®]). Esso viene rapidamente assorbito, dopo somministrazione orale.

Sono state stimate notevoli differenze nei valori di emivita del VPA nelle varie specie: 0.6 h nella scimmia, 0.8 h nel topo, 2.5 h nei ratti, 9 h nei gatti (Lagace et al. 2004). Nell'uomo il

tempo di dimezzamento è di circa 6-20 ore, ma viene ridotto quando il farmaco viene somministrato in associazione con altri AEDs.

La clearance del VPA è di circa 0.1-0.3 mL/min/kg (Moffat et al. 2004). Approssimativamente il 90-95% del farmaco si lega alle proteine plasmatiche, mentre il volume di distribuzione è di circa 0.1-0.5 L/kg (in media 0.2 L/kg) (Gennaro, 2000).

Il VPA viene metabolizzato nel fegato dove subisce glucuronizzazione, beta-ossidazione nei mitocondri e ossidazione a livello microsomiale.

L'eliminazione del VPA avviene principalmente con le urine: circa il 20% della dose viene escreta sotto forma di coniugato con acido glucuronico in circa 72 ore, la rimanente parte viene eliminata sotto forma di metaboliti secondari e, soltanto il 5% circa della dose, come farmaco immodificato (Moffat et al. 2004).

La dose iniziale di Valproato di sodio è di 600 mg giornalieri, da portare successivamente a 2.6 g. Concentrazioni plasmatiche superiori a 200 mg/L determinano, generalmente, effetti tossici.

Nell'organismo, è la forma indissociata del VPA ad essere responsabile dell'attività farmacologica, dal momento che solo quest'ultima può distribuirsi dal sangue ai tessuti mediante diffusione passiva. Tuttavia, il VPA presenta un basso volume di distribuzione, in quanto possiede un grado di ionizzazione abbastanza elevato a pH 7.4 e risulta molto meno liposolubile degli altri AEDs comunemente utilizzati (Löscher, 1999).

Il VPA possiede un ampio spettro d'azione nel trattamento di diversi tipi di stati epilettici e mostra, inoltre, efficacia terapeutica in altre malattie e disordini neurologici, quali disturbi bipolari e schizofrenia. Il VPA viene anche impiegato per la profilassi dell'emicrania e, di recente, è stato sottoposto a test clinici in pazienti affetti da cancro (Spiegelstein et al. 2003; Löscher, 1999; Wu et al. 2010, Bialer and Yagen, 2007; Gibbs et al. 2004; Johannessen, 2000).

L'ampio spettro d'azione del VPA sarebbe giustificato dai molteplici meccanismi attraverso i quali esso esplica la propria azione: effetto inibitorio a livello dei canali voltaggio-dipendenti del

Na⁺, incremento dei livelli di GABA, riduzione della trasmissione glutamatergica, incremento dell'inibizione serotoninergica (Winkler et al. 2005; Fischer et al. 2008).

Come già detto per gli AEDs in generale, anche la terapia con il VPA presenta alcuni limiti:

- distribuzione inadeguata a livello cerebrale;
- legame alle membrane biologiche;
- comparsa di teratogenicità ed epatotossicità, effetti collaterali rari, ma piuttosto gravi

(Bialer and Yagen, 2007; Shimshoni et al. 2008).

Studi condotti in passato hanno valutato il processo di diffusione del VPA nella corteccia cerebrale del ratto, rivelando che esso diffonde principalmente nello spazio extracellulare. Tale risultato è in accordo con quanto era stato precedentemente osservato da Chapman nel 1982, ovvero che la concentrazione di VPA, a livello cerebrale, risulta essere pari circa al 20% di quella plasmatica (Redecker et al. 2000).

Studi più recenti hanno dimostrato che il trattamento cronico dell'epilessia prevede dosi piuttosto elevate di VPA, confermando l'inadeguata concentrazione del farmaco a livello cerebrale, correlata, probabilmente, a meccanismi di trasporto asimmetrici a livello della BBB (Redecker et al. 2000, Gibbs et al. 2004). Infatti, nonostante il VPA riesca a raggiungere velocemente il cervello, è stata provata l'esistenza, a livello della BBB, di un processo attivo di efflusso più efficiente del sistema di trasporto del VPA all'interno del CNS (Gibbs et al. 2004).

In letteratura, studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che l'epatotossicità e la teratogenicità, associate all'assunzione di VPA, sono causate da due meccanismi, non soltanto distinti tra loro, ma anche differenti da quello attraverso il quale il farmaco esplica la propria attività anticonvulsivante (Löscher, 1999). In particolare, dell'epatotossicità non sembra essere responsabile il VPA di per sé, quanto due suoi metaboliti contenenti, nella loro struttura, un doppio legame terminale: 4-ene-VPA e 2,4-diene-VPA. Questi, una volta formati, verrebbero biotrasformati in intermedi chimici reattivi, in grado di instaurare legami con macromolecole ed enzimi cellulari coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi. Durante tale cascata di processi, si

formerebbe un tioestere dell'acil-coenzima A (CoA), che condurrebbe poi all'esaurimento del CoA nel fegato e, dunque, all'epatotossicità (Bialer and Yagen, 2007).

Diversamente da quest'ultima, la teratogenicità è associata alla struttura chimica del VPA stesso (Shimshoni et al. 2007).

Studi condotti in passato hanno dimostrato che sarebbero proprio alcuni requisiti strutturali del VPA ad essere responsabili dell'effetto collaterale. In particolare, è stato osservato che la teratogenicità si manifesta se, nella struttura chimica di una sostanza, è presente un carbonio terziario legante un gruppo carbossilico, un atomo di idrogeno e due catene alchiliche.

E' stato dimostrato, inoltre, che l'effetto teratogeno è maggiore se le catene alchiliche sono di tipo alifatico e contengono tre atomi di carbonio ciascuna, proprio come nel caso del VPA. (Spiegelstein et al. 2003, Bialer and Yagen, 2007, Isoherranen et al. 2003, Isoherranen et al. 2003, Bialer, 2006).

In aggiunta a quanto detto finora, è noto che la somministrazione del VPA prolungata nel tempo è spesso associata alla comparsa di disturbi endocrini e metabolici, soprattutto in pazienti adolescenti e donne di giovane età (Gibbs et al. 2004).

4. Nuovi agenti farmacologici ad azione antiepilettica

Per quanto riguarda la terapia della patologia epilettica, già da qualche decennio, sono in atto ricerche finalizzate a mettere a punto modelli sperimentali che possano riprodurre le varie forme di epilessia umana sotto diversi aspetti (elettrofisiologico, comportamentale e clinico), allo scopo di verificare i processi che sottendono la genesi, i meccanismi fisiopatologici e lo sviluppo della patologia epilettica. L'utilizzo di tali modelli, consentendo di sperimentare su un substrato che si avvicina notevolmente a quello umano (Pitkanen et al., 2007), potrebbe consentire di individuare possibili e più ampi target neuronali e di migliorare l'approccio terapeutico farmacologico (Sardo

et al. 2006; Sardo e Ferraro, 2007). D'altro canto, di pari passo con tali tipi di ricerche, ulteriori studi mirano alla sintesi di nuove molecole o alla derivatizzazione di farmaci già noti, allo scopo di ottenere AEDs provvisti di un migliore profilo farmacocinetico, maggiore efficacia e ridotta tossicità (Bialer and Yagen, 2007; Shimshoni et al. 2008). Tale orientamento è alla base di tutti quegli studi che hanno come obiettivo quello di scoprire nuovi approcci terapeutici finalizzati al trattamento, non soltanto dell'epilessia, ma di tutte le patologie che interessano il CNS. Numerosi sono, infatti, i farmaci che non possiedono caratteristiche chimico-fisiche adeguate per attraversare la BBB, processo indispensabile per il raggiungimento dell'effetto terapeutico. Tali evidenze hanno condotto allo sviluppo di svariate strategie al fine di favorire la veicolazione di farmaci al CNS, quali:

- modificazione chimica temporanea delle Tight Junctions;
- alterazione osmotica della BBB;
- iniezione diretta di farmaci nel cervello e/o nel fluido cerebrospinale;
- veicolazione di principi attivi mediante liposomi o nanoparticelle;
- somministrazione di farmaci per via transnasale;
- coniugazione di farmaci con anticorpi specifici per un recettore presente a livello della BBB;
- modificazione chimica di farmaci già noti (Pavan et al. 2008; Pardridge, 2007; Habgood et al. 2000; Smith, 2005).

Alcuni degli approcci elencati, oltre ad essere di tipo invasivo, sono risultati, talvolta, pericolosi per la regolare funzionalità della BBB (Pardridge, 1999; Temsamani et al. 2000). Tuttavia, una strategia non invasiva, in grado di migliorare i processi di assorbimento e penetrazione di un farmaco nel CNS, consiste nella modificazione chimica di una molecola di cui è già nota l'attività farmacologica, al fine di ottenere un suo succedaneo o derivato, che *in vivo*

possa subire una riconversione nel farmaco padre, ovvero nella realizzazione di “*chemical delivery systems*” (Anderson, 1996; Carelli et al. 1996).

In particolare, nuovi derivati possono essere ottenuti mediante la formazione di un legame covalente tra un farmaco e una molecola, che può fungere da *carrier* chimico. Tale coniugazione consente di modificare le proprietà chimico-fisiche del principio attivo, in modo da renderne ideale:

- il rapporto tra porzione idrofila e porzione lipofila, che, espresso in termini di coefficiente di Distribuzione (Log D), dovrebbe avere un valore compreso tra 0 e 3;
- il peso molecolare, che dovrebbe essere inferiore a 400 Da;
- la carica;
- il profilo di ionizzazione;
- il numero di legami ad idrogeno che può instaurare nell’ambiente fisiologico, numero che dovrebbe essere minore di 8 (Pajouhesh and Lenz; 2005 Shimshoni et al. 2007; Crivori et al. 2000; Abraham et al. 1994).

La coniugazione di un farmaco con un *carrier* consente, dunque, di ottenere nuove molecole che, sfruttando sistemi di trasporto di membrana, permeano la BBB e raggiungono il CNS, dove possono esplicare la loro attività come molecole farmacologicamente attive di per sè, o dopo avere subito una biotrasformazione enzimatica nel farmaco originario (profarmaci) (Smith, 2005; Stella and Himmelstein, 1982).

Le molecole generalmente impiegate come *carrier* chimici sono zuccheri, peptidi, proteine modificate o anticorpi monoclonali in grado di attraversare la BBB mediante un meccanismo di endocitosi mediata da recettore (Fernandez et al. 2003).

Effetti tossici legati a fenomeni di accumulo potrebbero essere evitati scegliendo carrier aminoacidici che, nel caso in cui dovessero scindersi dal farmaco a livello del CNS, rientrerebbero nei cicli metabolici fisiologici del tessuto cerebrale (Wolburg H. and Lippoldt A., 2002; De Vries et al. 1997).

Diversamente dagli AEDs tradizionalmente adoperati, che presentano strutture etrocicliche, il VPA, come detto precedentemente, ne possiede una piuttosto semplice che ben si presta alla derivatizzazione chimica (Johannessen, 2000; McLaughlin et al. 2000). Per questo motivo, esso è stato, nel corso degli anni, oggetto di numerosi studi che hanno condotto alla progettazione e alla sintesi di farmaci di seconda generazione, con lo scopo di:

- promuovere il raggiungimento del CNS, modificando le caratteristiche chimico-fisiche del VPA (Gibbs et al. 2004);
- incrementare la potenza rispetto al VPA;
- ridurre o eliminare l'epatotossicità associata alla somministrazione di VPA, limitando l'eventuale formazione di metaboliti contenenti un doppio legame terminale;
- prevenire la teratogenicità, eliminando dalla struttura chimica del VPA i requisiti strutturali responsabili di tale effetto collaterale (Redecker et al. 2000; Bialer and Yagen, 2007).

L'ottenimento di questo risultato dipende dalla scelta dell'opportuno *carrier* e dal suo legame con il farmaco, che deve essere stabile a livello sistemico, ma, allo stesso tempo, consentire l'interazione del principio attivo con il suo sito bersaglio, mantenendone, quindi, inalterato il meccanismo d'azione a livello molecolare.

Numerose molecole di interesse farmaceutico, tra cui il VPA, possiedono gruppi funzionali passibili di derivatizzazione (ossidrilici, carbossilici, amminici, etc.) ed il risultato di tale processo può portare alla formazione di composti con differente lipofilia, analoghi al farmaco padre, in grado di liberare *in vivo* il principio attivo attraverso reazioni chimiche e/o enzimatiche.

Nel caso di semplici reazioni chimiche, la possibilità di ottenere una selettività dell'attivazione nel sito d'azione è però estremamente ridotta.

Di seguito sono riportati alcuni studi presenti in letteratura riguardanti la derivatizzazione chimica del VPA.

Derivati in forma esterea del VPA sono stati ottenuti mediante la coniugazione dello stesso con xilitolo e con glucosio. L'attività antiepilettica posseduta da tali nuove molecole è stata testata utilizzando diversi modelli animali di epilessia, in cui l'attività epilettiforme veniva indotta con pentilenetetrozolo o mediante riduzione della concentrazione di Mg^{+2} nel fluido cerebrospinale artificiale (aCSF). I nuovi derivati sono risultati più efficaci rispetto alla già nota valpromide e al VPA stesso (Armand et al. 1998).

In uno studio del 2000, sono state riportate la sintesi e la valutazione dell'attività antiepilettica di derivati amidici ed esterei e di analoghi strutturali del VPA. Delle molecole sintetizzate, molte sono risultate farmacologicamente inattive o hanno presentato la stessa attività posseduta dal farmaco originario. Fra tutti, sono risultati essere più efficaci i derivati esterei del VPA e, in particolare, gli esteri ottenuti mediante la coniugazione dello stesso con mannitolo. Questi hanno mostrato di agire mediante un meccanismo d'azione differente, risultando, a tutti gli effetti, dei nuovi AEDs (Redecker et al. 2000).

In un ulteriore studio del 2003 sono stati ottenuti nuovi derivati della taurinamide, che hanno mostrato, nei modelli animali impiegati, una discreta attività antiepilettica ed una teratogenicità ridotta, rispetto al VPA (Isoherranen et al. 2003).

In letteratura si riscontra anche la presenza di molteplici derivati amidici, tra i quali un'amide di un analogo ciclopropilico del VPA, la 2,2,3,3-tetrametilciclopropancarboneil-urea. Questi, nei modelli animali di epilessia impiegati nello studio, hanno mostrato una maggiore potenza rispetto al VPA e teratogenicità ed epatotossicità ridotte (Sobol et al. 2006; Bialer and Yagen, 2007; Shimshoni et al. 2007).

Il successo di tale approccio terapeutico dipende essenzialmente dall'influenza di alcuni fattori, quali:

- adeguata accessibilità del *derivato* al “sito target”;
- adeguata farmacocinetica del *derivato* e del principio attivo;
- inerzia farmacologica del *carrier* e dei suoi metaboliti (Anderson, 1996).

Basandosi su questi presupposti, i nuovi ***addotti farmaco-aminoacido*** sintetizzati nell'ambito di questa ricerca, dovrebbero superare facilmente la BBB, raggiungere il CNS e svolgere l'attività farmacologica come tali o dopo liberazione il principio attivo mediante reazione di riconversione *in situ*.

SCOPO DELLA RICERCA

L'esigenza di progettare e realizzare nuovi farmaci ad azione antiepilettica dotati di maggiore efficacia e potenzialmente meno tossici rispetto al VPA hanno motivato, in questa ricerca, la scelta di derivatizzare quest'ultimo. Il VPA è stato inoltre scelto in quanto possiede, come detto precedentemente, una struttura chimica piuttosto semplice e che si presta, dunque, allo scopo.

Alla luce delle osservazioni riportate in merito ai limiti della terapia con VPA, primo obiettivo di questo lavoro è stato quello di sintetizzare nuovi derivati di tale farmaco mediante la coniugazione dello stesso con aminoacidi essenziali neutri.

Tale coniugazione potrebbe permettere di:

- modificare le caratteristiche chimico-fisiche del VPA, ottenendo dei nuovi derivati con un profilo più idoneo all'attraversamento delle membrane biologiche e, in particolare, della BBB (Bousquet et al. 1993; Giannola et al. 1996);
- eliminare, dalla struttura chimica del VPA, i requisiti responsabili della teratogenicità, ottenendo dei nuovi derivati privi di tale effetto collaterale;
- evitare la formazione di metaboliti contenenti un doppio legame terminale e quindi, tossici a livello epatico;
- ottenere nuovi derivati del VPA dotati di maggiore efficacia, in modo da raggiungere l'effetto farmacologico a dosi inferiori, con conseguente riduzione degli effetti collaterali dose-dipendenti causati dal farmaco originario (Giannola et al. 1998; Terasaki and Tsuji, 1994).

Una volta sintetizzati e caratterizzati i derivati, saranno condotti esperimenti finalizzati alla valutazione di alcuni parametri, utili per predire il comportamento dei coniugati aminoacidici del VPA negli ambienti biologici.

In particolare, dal momento che la lipofilia di un farmaco è un fattore particolarmente rilevante, che ne influenza il raggiungimento del CNS, sarà calcolato, per i nuovi derivati del VPA, il Coefficiente di Distribuzione (espresso in termini di Log D), quale indice dell'attitudine posseduta da una molecola all'attraversamento della BBB (Pajouhesh and Lenz, 2005).

La stabilità di un farmaco nel plasma umano è un aspetto di fondamentale importanza per mantenere la sua emivita e una concentrazione adeguata per il raggiungimento dell'effetto farmacologico (Di et al. 2005). Pertanto, è stato posto, come ulteriore obiettivo della ricerca, quello di valutare tale parametro, per tutti gli N-valproil-L-derivati sintetizzati.

La stabilità enzimatica dei nuovi derivati del VPA, oltre che in plasma umano, sarà valutata anche in omogenato di cervello di ratto.

Allo scopo di individuare un'eventuale somministrabilità dei derivati *per os*, saranno condotti studi di stabilità chimica, impiegando soluzioni tampone a diversi valori di pH, simulanti fluidi biologici dell'ambiente gastrointestinale.

Ulteriore obiettivo del lavoro di tesi è quello di valutare l'attività antiepilettica posseduta dagli N-valproil-L-derivati, paragonandola a quella del VPA. A tal fine, sarà utilizzato un modello sperimentale di epilessia ippocampale *in vitro* su fettine di encefalo di ratto (Seizure like events – SLEs) (Sokolowa et al. 1998).

Tale modello sperimentale è sembrato idoneo al nostro scopo, dal momento che consente una valutazione diretta dell'attività farmacologica posseduta da un farmaco, consentendo di escludere gli effetti della BBB e del metabolismo in altri organi.

MATERIALI E METODI

1. Materiali e apparecchiature utilizzate per lo studio chimico-farmaceutico

L'acido valproico 99% (VPA), la L-istidina metil estere bicloridrato e la 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) sono stati acquistati presso la ditta Acros Organics (Geel, Belgio), la L-fenilalanina etil estere cloridrato, la Trietilamina (TEA) e tutti i componenti per le soluzioni tampone sono stati acquistati presso la ditta Sigma-Aldrich-Chemie (Steinheim, Germany), la L-metionina metil estere cloridrato e l'L-triptofano metil estere cloridrato sono stati acquistati presso la ditta Novabiochem (HoeHENbrunn, Germania), la *N,N'*-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) presso la Merck (HoeHENbrunn, Germany). I solventi per l'analisi con HPLC sono stati acquistati presso la ditta Baker (Milano, Italia). Tutti i prodotti chimici ed i solventi erano di purezza analitica e sono stati pertanto utilizzati senza la necessità di ulteriori processi di purificazione. L'analisi TLC (thin layer chromatography) è stata condotta utilizzando lastre di silice (spessore dello strato 0.20 mm), stratificate su lamine in alluminio, contenenti indicatore di fluorescenza F254, prodotte da Alugram® SIL G/UV254 Silica Macherey-Nagel (Germany) e visualizzate usando una lampada UV a $\lambda = 254$ nm.

I punti di fusione (m.p.) sono stati determinati, in capillare, con un'apparecchiatura Büchi 530 e non sono stati corretti.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati in un range di 4000-400 cm^{-1} , utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 FT. Le frequenze sono state misurate come media di 20 scansioni. I prodotti di reazione sono stati analizzati come dispersione in Nujol.

Gli spettri UV sono stati realizzati con uno spettrofotometro Shimadzu UV-Vis 1700 PharmaSpec. Durante gli esperimenti di stabilità chimica ed enzimatica, l'analisi HPLC è stata eseguita utilizzando un apparecchio Shimadzu LC-10AD_{VP}, dotato di un sistema a due pompe

LC-10AD_{VP}, un detector UV a diodi SPD-M20A, un loop da 20 µl e un sistema di integrazione computerizzato (EZ start 7.3 software). L'analisi cromatografica è stata effettuata su una colonna a fase inversa Discovery HS F5 (Supelco 25 cm x 4.6 mm, 5 µm). Il flusso della fase mobile è stato settato ad 1 ml/min. Per i diversi addotti sintetizzati sono state scelte fasi mobili differenti e lunghezze d'onda opportune. In particolare:

- per l'N-valproil-L-triptofano ($\lambda = 280$ nm), eluizione in gradiente acqua : metanolo (90:10 per 15 min, seguito da 90:10→10:90, in 15 min, e mantenuto 10:90 per ulteriori 20 min); in tali condizioni il tempo di ritenzione è risultato pari a 27 min. LOQ (limit of quantification) 0,02 mg/ml.
- per l'N-valproil-L-fenilalanina ($\lambda = 201$ nm) eluizione in isocratica TFA 0.01% : metanolo 40:60. In tali condizioni il tempo di ritenzione è risultato pari a 15 min. LOQ 0,06 ml/ml.
- per l'N-valproil-L-istidina ($\lambda = 214$ nm) eluizione in isocratica TFA 0.01% : metanolo 75:25. In tali condizioni il tempo di ritenzione è risultato pari a 14 min. LOQ 0,06 ml/ml.
- per l'N-valproil-L-metionina ($\lambda = 201$ nm) eluizione in isocratica TFA 0.01% : metanolo 40:60. In tali condizioni il tempo di ritenzione è risultato pari a 10 min. LOQ 0,06 ml/ml.

Le aree dei picchi, i tempi di ritenzione e le curve di taratura sono state calcolate utilizzando il software EZ start.

Gli spettri ^{13}C ed ^1H NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Avance 300, operante a 300.13 MHz per gli spettri del ^1H e a 75.47 MHz per gli spettri del ^{13}C , in soluzione di CD_3OD . I chemical shifts del protone e del carbonio, espressi in parti per milione (ppm), sono stati rapportati al segnale di risonanza del solvente centrato rispettivamente a 3.31 e 49.00 ppm, rispetto al Me_4Si .

Le analisi di spettrometria di massa ESI-MS (Electrospray ionization-mass) sono state effettuate, per infusione diretta (10 µl/min), con uno spettrometro di massa Autospec Tof Ultima, MicroMass Magnetic Sector Orthogonal Tof Spectrometer (spray voltage 4000 V; cone voltage 20 V; temperatura del capillare 40°C; gas di collisione: argon 1×10^{-6} atm).

Tutti i dati sperimentali sono stati elaborati mediante l'utilizzo dei software Kaleidagraph e Curve Expert 1.34 per Windows.

2. Metodo generale per la sintesi degli N-valproil-L-derivati

2.1. I step: Sintesi degli N-Valproil-L-derivati esterei

Le sintesi degli N-valproil-L-derivati esterei sono state condotte utilizzando un metodo messo a punto modificandone uno precedentemente descritto in letteratura (Giannola et al. 1998). Le reazioni sono state effettuate in soluzione di diclorometano anidro (CH_2Cl_2) (30 ml ca) alla temperatura di 25°C. Alla soluzione contenente l'estere dell'aminoacido cloridrato (0.005 moli) è stata aggiunta TEA (0.005 moli) e, dopo 15 min di costante agitazione, VPA (0.005 moli), DCC e 0.0005 moli di DMAP.

La reazione è stata mantenuta a temperatura costante e sotto agitazione, per un opportuno tempo di reazione, variabile da 2 a 24 ore, a seconda del derivato aminoacidico da ottenere. Il monitoraggio della reazione è stato effettuato mediante TLC usando come eluente la miscela costituita da etere di petrolio, cloroformio ed acetato di etile nel rapporto 10/65/25.

Al termine di ogni reazione, sono stati aggiunti 0.5 ml di acqua distillata alla miscela di reazione. Successivamente la miscela è stata filtrata, per eliminare la N,N'-dicicloesilurea formatasi a partire dalla DCC. Il filtrato ottenuto è stato anidrificato con solfato di sodio (Na_2SO_4) ed evaporato a pressione ridotta fino a totale eliminazione del solvente di reazione.

Il residuo secco ottenuto è stato solubilizzato in CH_2Cl_2 (20 ml) al fine di effettuare delle estrazioni, mediante un imbuto separatore, con aliquote (2 x 20 ml) di acqua acida a pH 4.0, aliquote (2 x 20 ml) di acqua basica a pH 8.0 e aliquote (2 x 20 ml) di acqua neutra a pH 7.0. Al termine di tali trattamenti, la fase organica è stata separata da quella acquosa, anidrificata con Na_2SO_4 e, infine, evaporata a pressione ridotta fino a totale allontanamento del solvente.

Il grezzo è stato lavato con due aliquote da 40 ml ciascuna di acetone a 0° C, al fine di

eliminare il cloridrato della TEA e DCU, insolubili in tale solvente. La soluzione acetonica è stata filtrata ed evaporata a pressione ridotta fino a secchezza. I prodotti grezzi ottenuti sono stati purificati per cristallizzazioni ripetute, da opportuno solvente, e identificati mediante metodi spettroscopici.

2.2. II step: Idrolisi degli N-Valproil-L-derivati esterei

0.004 moli di ciascun N-valproil-L-derivato estereo sono state aggiunte ad una miscela costituita da soluzione acquosa 2N di NaOH (8 ml) e metanolo (4 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per circa 24 ore.

Trascorso tale tempo, la soluzione è stata filtrata e acidificata con una soluzione di HCl diluita fino a raggiungere un pH acido di circa 4. In tali condizioni si assiste alla precipitazione di una massa bianca flocculosa, che viene separata per filtrazione e lasciata asciugare per 24 ore. Una volta asciutta, la massa bianca viene purificata per ripetute cristallizzazioni con opportuno solvente.

2.2.1. N-valproil-L-fenilalanina (6a)

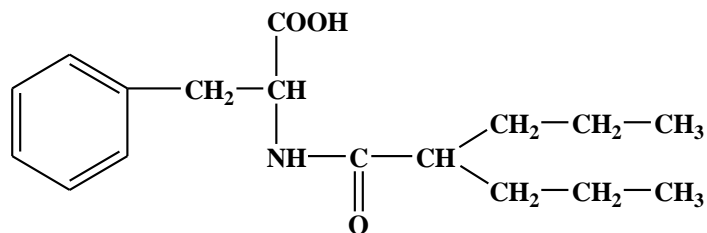
I step:

A 30 ml di CH₂Cl₂ sono stati aggiunti: L-fenilalanina etil estere cloridrato (1.14 g, 0.005 moli), VPA (0.72 g, 0.005 moli), TEA (0.50 g, 0.005 moli), DMAP (0.061 g, 0.0005 moli) e DCC (1.03 g, 0.005). La miscela è stata posta a temperatura ambiente e sotto costante agitazione per 2 ore.

II step:

N-valproil-L-fenilalanina etil estere (1.28 g, 0.004 moli) è stata aggiunta a una miscela costituita da soluzione acquosa 2N di NaOH (8 ml) e metanolo (4 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per 24 ore.

Caratterizzazione dell'*N*-Valproil-L-Fenilalanina



- Solvente di cristallizzazione: acetato di etile/cicloesano (3/7);
- Punto di fusione: 148 °C;
- UV (metanolo): λ_{max} a 252, 258, 263 nm;
- IR (nujol): 3293 (stretching NH amidico), 1714 (stretching C=O carbossilico), 1646 (stretching C=O amidico) e 1536 (bending -NH- amidico) cm^{-1} ;
- MS: m/z 292 (M^+), 249, 218, 204, 166, 148, 131, 120, 99, 91, 83, 65, 57;
- ^1H e ^{13}C -NMR chemical shifts in ppm in Tabella 3;
- Resa: 77%.

2.2.2. *N*-valproil-L-triptofano (6b)

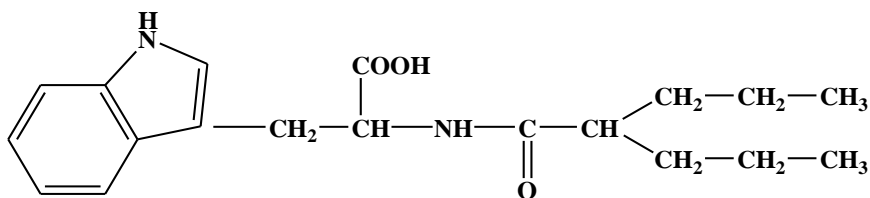
I step:

A 30 ml di CH_2Cl_2 sono stati aggiunti: L-triptofano metil estere cloridrato (1.27 g, 0.005 moli), VPA (0.72 g, 0.005 moli), TEA (0.50 g, 0.005 moli), DMAP (0.061 g, 0.0005 moli) e DCC (1.03 g, 0.005). La miscela è stata posta a temperatura ambiente e sotto costante agitazione per 2 ore.

II step:

N-valproil-L-triptofano metil estere (1.38 g, 0.004 moli) è stato aggiunto a una miscela costituita da soluzione acquosa 2N di NaOH (8 ml) e metanolo (4 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per 24 ore.

Caratterizzazione dell'*N*-Valproil-L-Triptofano



- Solvente di cristallizzazione: acetato di etile/cicloesano (3/7);
- Punto di fusione: 125 °C;
- UV (alcool metilico): λ_{max} a 289, 279 nm;
- IR (nujol): 3386 (stretching NH indolico), 3283 (stretching NH amidico), 1712 (stretching C=O carbossilico), 1648 (stretching C=O amididico), 1534 (bending -NH- amidico) cm⁻¹;
- m/z (abbondanza relativa) = 330 (43, M +), 312 (79), 284 (15), 231 (4), 188 (57), 170 (35), 158 (76), 144 (92), 129 (91), 117 (100), 103 (86), 77 (80), 99 (10), 57 (70), 43(57);
- ¹H e ¹³C-NMR chemical shifts in ppm in Tabella 5;
- Resa: 65%.

2.2.3. *N*-valproil-L-istidina (6c)

I step:

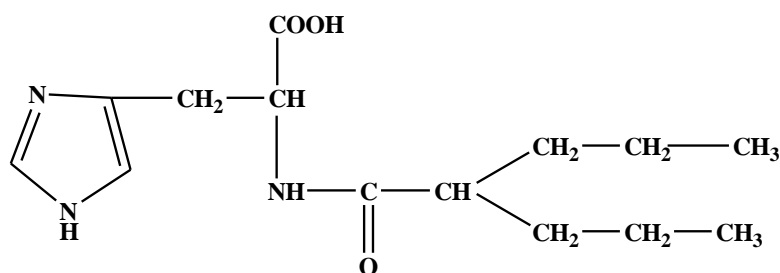
A 30 ml di CH₂Cl₂ sono stati aggiunti: L-istidina metil estere bicloridrato (1.21 g, 0.005 moli), VPA (0.72 g, 0.005 moli), TEA (1.01 g, 0.01 moli), DMAP (0.061 g, 0.0005 moli) e DCC (1.03 g, 0.005). La miscela è stata posta a temperatura ambiente e sotto costante agitazione per 24 ore.

II step:

N-valproil-L-istidina metil estere (1.18 g, 0.004 moli) è stato aggiunto ad una miscela costituita da soluzione acquosa 2N di NaOH (8 ml) e metanolo (4 ml). La reazione è stata

condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione costante 24 ore . Poiché dopo acidificazione il prodotto non precipita, la soluzione viene posta in essiccatore fino a ottenimento di un grezzo solido. Tale grezzo viene quindi successivamente trattato con metanolo (ca 20 ml) e la quota di materiale rimasto insolubile viene allontanata per filtrazione. La soluzione viene ridotta di volume (ca 5 ml) ed addizionata di etile acetato (ca 20 ml). Si forma un precipitato bianco che viene purificato per ripetute cristallizzazioni.

Caratterizzazione dell'*N*-Valproil-L-istidina; il prodotto viene ottenuto sottoforma di cloridrato.



- Solvente di cristallizzazione: metanolo/acetato di etile (1/4);
- Punto di fusione: 180 °C;
- IR (nujol): 3159 (stretching NH amidico), 1648 (stretching C=O amidico) e 1542 (bending -NH- amidico) cm^{-1} ;
- MS: m/z = 281 (M^+), 263, 235, 221, 164, 144, 137, 120, 110, 99, 94, 81, 69, 57, 44;
- ^1H e ^{13}C -NMR chemical shifts in ppm in Tabella 7;
- Resa: 55%.

2.2.4. N-valproil-L-metionina (6d)

I step:

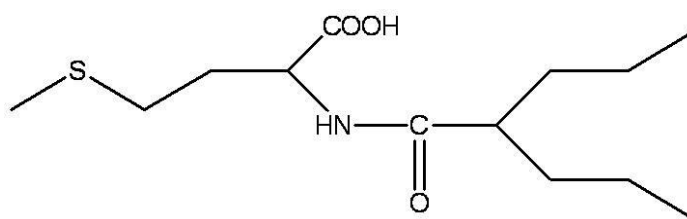
A 30 ml di CH_2Cl_2 sono stati aggiunti: L-metionina metil estere cloridrato (1.0 g, 0.005 moli),

VPA (0.72 g, 0.005 moli), TEA (0.50 g, 0.005 moli), DMAP (0.061 g, 0.0005 moli) e DCC (1.03 g, 0.005). La miscela è stata posta a temperatura ambiente e sotto costante agitazione per 24 ore.

II step:

N-valproil-L-metionina metil estere (1.16 g, 0.004 moli) è stata aggiunta a una miscela costituita da soluzione acquosa 2N di NaOH (8 ml) e metanolo (4 ml). La reazione è stata condotta a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per 24 ore.

Caratterizzazione dell' *N*-Valproil-L-metionina



- Solvente di cristallizzazione: acetato di etile/ n-esano (3/7);
- Punto di fusione: 88 °C;
- IR (nujol): 3291 (stretching NH amidico), 1715 (stretching C=O carbossilico), 1644 (stretching C=O amididico), 1536 (bending -NH- amidico) cm^{-1} ;
- MS: m/z = 276 (M^+), 258, 228, 201, 183, 159, 140, 131, 104, 98, 86, 71, 57;
- ^1H e ^{13}C -NMR chemical shifts in ppm in Tabella 9;
- Resa: 89%.

3. Determinazione del Coefficiente di Distribuzione ($D^{pH7.4}$) degli N-valproil-L-derivati

Il parametro calcolato per valutare la lipofilia degli N-valproil-L-derivati, utile anche come indice predittivo della loro attitudine all'attraversamento delle membrane biologiche, è il Coefficiente di Distribuzione (D) a pH fisiologico (7.4). Tale parametro, espresso come $\text{Log } D^{pH7.4}$, esprime un valore di ripartizione dei farmaci misurato sperimentalmente, utilizzando come fase oleosa l'ottanolo e come fase acquosa una soluzione a pH 7.4, simulante le condizioni fisiologiche del plasma umano, e considerando tutte le specie in soluzione. In queste condizioni, le molecole presentano *in vitro* i medesimi legami ad idrogeno e fenomeni di ionizzazione che si riscontrano *in vivo*.

Il Coefficiente di Distribuzione ($D^{pH 7.4}$) degli N-valproil-L-derivati è stato determinato alla temperatura di 20 °C e ad una pressione di 1.013×10^5 Pa, disperdendo di volta in volta, una quantità pari a 10 mg per i composti **6a**, **6b** e **6c** e pari a 2 mg per il composto **6d** in una miscela bifasica costituita da 10 ml di n-ottanolo e 10 ml di tampone fosfato 0.02 M a pH 7.4. Il Coefficiente di Distribuzione è stato espresso come $\text{Log } D$. Tale miscela è stata posta in un imbuto separatore ed agitata per 30 minuti, al fine di favorire l'intimo contatto tra le due fasi e la ripartizione della molecola. L'equilibrio tra le due fasi è stato raggiunto dopo circa 1 ora. A questo punto le due fasi sono state separate e la fase oleosa è stata anidrificata con Na_2SO_4 e poi filtrata. La concentrazione dei prodotti **6a** e **6b** nelle fasi organica ed acquosa è stata determinata mediante analisi spettrofotometria UV utilizzando una curva di calibrazione appropriata e un bianco adeguato. La concentrazione dei prodotti **6c** e **6d** nella fase acquosa è stata determinata mediante analisi HPLC, utilizzando il metodo e la curva di calibrazione appropriati. Il $\text{Log } D$ relativo ai prodotti **6a**, **6b**, **6c** e **6d** è stato determinato come media di cinque esperimenti.

Il valore di $D^{pH7.4}$ è stato calcolato secondo l'equazione:

$$D^{pH7.4} = \frac{C_i - C_w}{C_w} \left(\frac{V_w}{V_o} \right)$$

dove C_i e C_w rappresentano, rispettivamente, la concentrazione del farmaco prima e dopo la separazione, mentre V_w e V_o sono i volumi della fase acquosa e della fase organica rispettivamente.

Il valore di D è costante a temperatura e pressione costanti.

4. Studi di stabilità degli N-valproil-L-derivati

4.1. In soluzioni tampone simulanti fluidi biologici

La stabilità chimica dei derivati **6a**, **6b**, **6c** e **6d** è stata valutata ad una temperatura di 37 ± 0.5 °C utilizzando soluzioni tampone con un pH compreso nel range 1.2 -8.0. Al fine di studiare la stabilità chimica dei prodotti, ciascuno di essi è stato solubilizzato, in quantità diverse da derivato a derivato, nelle soluzioni tampone appropriate.

- Composto **6a**: 5mg in 5 ml di soluzione tampone specifica (conc = 1 mg/ml);
- Composto **6b**: 2mg in 50 ml di soluzione tampone specifica (conc = 0.04 mg/ml);
- Composto **6c**: 2.5 mg in 5 ml soluzione tampone specifica (conc = 0.5 mg/ml);
- Composto **6d**: 2.5 mg in 5 ml soluzione tampone specifica (conc = 0.5 mg/ml).

Ad intervalli di 60 minuti sono stati effettuati prelievi da 25 µl, che sono stati immediatamente analizzati mediante tecnica HPLC.

Parallelamente, al fine di osservare potenziali riarrangiamenti molecolari, sono stati condotti,

per i derivati **6a** e **6b**, degli studi mediante spettrofotometria UV-Vis nel range di lunghezze d'onda comprese tra 200 e 800 nm. Durante tali esperimenti 3 ml della soluzione iniziale sono stati posti in una cella UV di quarzo, mantenuti a temperatura costante ed analizzati mediante scansioni spettrofotometriche ogni 30 minuti. Gli esperimenti sono stati condotti per 24 ore e ripetuti tre volte.

4.2. In plasma umano

Al fine di valutare la stabilità dei derivati in plasma umano, sono stati prelevati campioni di sangue da un donatore sano. Questi sono stati successivamente trattati con EDTA, centrifugati e il plasma, dopo essere stato separato dalla frazione corpuscolata, è stato aliquotato.

La stabilità dei composti è stata valutata in plasma umano all'80%, diluito con tampone fosfato (PBS) a pH 7.4.

La reazione è stata condotta, per i derivati **6a**, **6b**, **6c** e **6d**, nel seguente modo:

- composti **6a** e **6d**: 200 µl di una soluzione madre di ciascuno dei due derivati in PBS a pH 7.4 (rispettivamente alla concentrazione di 2 mg/ml, per il derivato **6a**, e di 3 mg/ml, per il derivato **6d**) sono stati addizionati a 800 µl di plasma umano preconditionato (37 ± 0.5 °C);
- composti **6b** e **6c**: 125 µl di una soluzione madre di ciascuno dei due derivati in PBS a pH 7.4 (rispettivamente alle concentrazioni di 2.02 mg/ml, per il derivato **6b**, e di 6 mg/ml, per il derivato **6c**) sono stati addizionati ad 1 ml di plasma umano preconditionato (37 ± 0.5 °C).

Le miscele sono state poste in un bagno termostato a 37 ± 0.5 °C e mantenute sotto costante agitazione. Ad intervalli di tempo appropriati (30 minuti), da tali soluzioni, sono stati prelevati campioni da 25 µl ai quali sono stati aggiunti 25 µl di metanolo allo scopo di inattivare gli enzimi plasmatici. Tali campioni sono stati poi centrifugati a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415C, Germania) per tre minuti; il surnatante è stato trasferito in una provetta di vetro ed immediatamente conservato ad una temperatura di -20 °C fino al momento di essere analizzato

mediante HPLC. ciascun esperimento di stabilità è stato condotto per 24 ore ed è stato ripetuto tre volte.

4.3. In omogenato di cervello di ratto

Ratti appartenenti al ceppo Wistar, acquistati presso la ditta Harlan (Italia), sono stati allevati seguendo le direttive di un veterinario provvisto di adeguata licenza e secondo l'attuale normativa sugli animali da esperimento. Il numero di animali utilizzati per i nostri esperimenti è stato minimizzato così come la loro sofferenza.

Al fine di studiare la stabilità enzimatica in ambiente cerebrale degli N-valproil-L-derivati, ratti Wistar adulti (300-350 g) sono stati anestetizzati con cloroformio e successivamente sacrificati mediante decapitazione.

Il cervello è stato immediatamente espantato ed omogeneizzato in tampone di lisi nuclei buffer NB, contenente: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM KCl, 0.15 mM stermina, 0.15 mM spermidina, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA) supplementato con saccarosio (0.32 M).

L'omogenato prodotto è stato centrifugato a 60.000 g per 10 minuti alla temperatura di 4 °C e il surnatante è stato suddiviso in aliquote da 400 µl ciascuna che sono state conservate ad una temperatura di -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

La reazione è stata condotta, per i derivati **6a**, **6b**, **6c** e **6d**, nel seguente modo:

- composto **6a**: 200 µl di una soluzione madre di **6a** in PBS a pH 7.4 (conc = 0.2 mg/ml) sono stati addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionato (37± 0.5 °C);
- composto **6b**: 100 µl di una soluzione madre di **6b** in PBS a pH 7.4 (conc = 2.09 mg/ml) sono stati addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionato (37± 0.5 °C);
- composto **6c**: 200 µl di una soluzione madre di **6c** in PBS a pH 7.4 (conc = 2.5 mg/ml) sono stati addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionato (37± 0.5 °C);

°C);

- composto **6d**: 200 µl di una soluzione madre di **6d** in PBS a pH 7.4 (conc = 3.0 mg/ml) sono stati addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionato (37 ± 0.5 °C).

Le reazioni sono state poste in un bagnomaria termostato alla temperatura di 37 ± 0.5 °C e sotto costante agitazione. Ad intervalli di tempo appropriati (30 minuti), sono stati effettuati prelievi di campioni da 25 µl ciascuno ed addizionati di 25 µl di metanolo allo scopo di inattivare gli enzimi cerebrali presenti. I prelievi sono stati poi sottoposti a centrifugazione a 14.000 rpm per 3 minuti; il surnatante è stato trasferito in una provetta di vetro ed immediatamente conservato ad una temperatura di -20 °C fino al momento di essere analizzato mediante HPLC. Ciascun esperimento di stabilità è stato condotto per 24 ore ed è stato ripetuto tre volte.

5. Studio elettrofisiologico degli effetti degli N-valproil-L-derivati in un modello sperimentale di epilessia ippocampale in vitro nel ratto

5.1. Animali

Ratti Wistar sono stati acquistati presso la ditta Harlan (Milano, Italia). Gli animali sono stati stabulati in locali con temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) ed umidità ($60 \pm 5\%$) costanti e sottoposti ad un ciclo di luce/buio con periodi di 12 h. Cibo e acqua erano costantemente disponibili. Durante tutte le procedure sperimentali è stata prestata particolare attenzione a ridurre al minimo il numero degli animali usati e le sofferenze provocate dalle procedure chirurgiche. Gli esperimenti sono stati svolti in accordo con lo “European Communities Council Directive” (86/609/EEC), in ottemperanza alle leggi italiane in materia di sperimentazione animale (D.L. 116/1992) e secondo le linee della “Guida per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio” (1986) dell'Istituto

Nazionale della Salute, approvato dal Ministero della Salute.

5.2. Preparazione delle fette di encefalo di ratto e induzione dell'attività epilettica

Ratti Wistar maschi, 3-4 settimane, sono stati anestetizzati con cloroformio e decapitati. Successivamente il loro cervello è stato espantato con cura e, nel più breve tempo possibile, è stato trasferito in un bagno contenente fluido cerebrospinale artificiale (aCSF) ossigenato (95% O₂ - 5% CO₂) alla temperatura di 1-4 °C, dove è stato tenuto per circa 3 minuti. La composizione dell'aCSF è mostrata nella Tabella 1 riportata di seguito.

Dal cervello, inizialmente, è stata ricavata una sezione coronale grossolana avente uno spessore di circa 3-4 mm e, da questa, con l'ausilio di un vibratomo (mod. MA752, Vibroslice Campden, Loughborough, UK), sono state ottenute fettine orizzontali o coronali, aventi uno spessore di 400-600 µm. Le fettine preparate con tale procedura sono state lasciate riposare per circa un'ora in aCSF ossigenato alla temperatura di 4°C e successivamente sono state poste, una alla volta, nella camera di registrazione dove sono state continuamente perfuse con aCSF ossigenato, alla temperatura costante di 33°C. La camera di registrazione è stata posta all'interno di una gabbia di Faraday, collocata su un tavolo antivibrazione, per minimizzare le interferenze elettromagnetiche ambientali sulla registrazione.

5.3. Elettrofisiologia

I potenziali elettrici extracellulari sono stati registrati nell'area CA1 dell'ippocampo impiegando un microelettrodo di vetro borosilicato riempito con una soluzione di NaCl 2M. Tale elettrodo, dotato di una resistenza pari a 2-6 MΩ e di una punta con diametro 1 µm, è stato inserito nel tessuto con l'ausilio di uno stereomicroscopio binoculare.

I potenziali elettrici rilevati sono stati amplificati e filtrati da un amplificatore ad alta impedenza (Multiclamp 700B, Axon Instruments, Molecular Devices, CA, U.S.A.), discriminati da apposite finestre (mod. 121, World Precision Instruments, Sarasota, FL, U.S.A.)

e, infine, visualizzati tramite oscilloscopio Tektronix 5113 (Beaverton, OR, U.S.A.). Sull'attività di scarica registrata è stata operata una conversione analogico-digitale mediante computer che, in tempo reale, ha permesso di costruire un istogramma di frequenza (numero di eventi/tempo, firing rate). Oltre alla frequenza di scarica, sono stati analizzati, in modalità off-line, altri parametri, quali la modalità di scarica neuronale (firing pattern, distribuzione degli intervalli interspike e funzione di autocorrelazione) e la forma d'onda dei singoli potenziali d'azione. Tutte le operazioni condotte mediante computer sono state effettuate utilizzando il software SciWorks package, version 5.0 (Datawave Technologies, Berthoud, CO, U.S.A.).

5.4. Studi elettrofisiologici: Seizure-Like Events (SLEs) e analisi statistica

Al fine di indurre un'attività epilettica a livello ippocampale, la fetta posta nella camera è stata perfusa da un flusso continuo (2 ml/min) di aCSF modificato, la cui composizione viene riportata in Tabella 1. La variazione della concentrazione di alcune specie ioniche presenti in tale mezzo di perfusione, dopo circa 90 minuti di incubazione della fetta, ha determinato lo sviluppo di burst epilettici spontanei nella regione CA1 dell'ippocampo. In particolare, tale effetto è stato ottenuto incrementando la concentrazione del potassio (8.0 mM) e riducendo quella del calcio (1.0 mM) e del magnesio (1.5 mM) (Sokolova et al.1998) nell'aCSF (Tab. 1).

<i>aCSF</i>		<i>aCSF modificato</i>	
NaCl	124 mM	NaCl	124 mM
KCl	3 mM	KCl	8 mM
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	NaH ₂ PO ₄	1,25 mM
NaHCO ₃	26 mM	NaHCO ₃	26 mM
CaCl ₂	1,6 mM	CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1,8 mM	MgSO ₄	1,5 mM
Glucosio	10 mM	Glucosio	10 mM

Tab. 1. Composizioni dell'aCSF e dell'aCSF modificato

La definizione e il rilevamento dei burst sono stati ottenuti in modo automatico, impostando opportunamente tre parametri (durata minima, durata dell'offset e soglia) nel modulo riguardante l'analisi dei burst del software Sciworks.

Ottenuta un'attività di scarica costante (generalmente dopo circa 30 minuti dalla comparsa dei burst) sono stati somministrati i farmaci da saggiare. Questi ultimi sono stati solubilizzati, alle concentrazioni desiderate, nel liquido di perfusione. In un primo momento, allo scopo di validare il metodo utilizzato e di quantificare le risposte di base del modello, è stato somministrato VPA alle concentrazioni 0.5, 1.0 e 2.0 mM. Successivamente, al fine di confrontare l'efficacia antiepilettica dei nuovi derivati aminoacidici sintetizzati durante questa ricerca con quella del VPA, sono stati somministrati i composti **6a** e **6b** alle concentrazioni: 1.0, 0.5 e 0.2 mM. Tutti i trattamenti farmacologici effettuati hanno avuto una durata standard, di 15 minuti, stabilita in base a studi di cinetica del VPA precedentemente condotti su fette di cervello (Sokolova et al. 1998) e in base agli effetti farmacologici del VPA osservati durante questo studio elettrofisiologico. Al fine di confrontare statisticamente gli effetti indotti dai diversi trattamenti sul firing dei neuroni registrati, sono state valutate tanto la frequenza che la durata dei burst. Per ogni somministrazione tali parametri sono stati calcolati sia durante il trattamento, sia

nell'intervallo di tempo successivo ad esso e paragonati ai valori misurati nel minuto, precedente al trattamento.

L'andamento temporale di entrambi i parametri è stato analizzato effettuando la somma dei loro valori in ogni periodo successivo (bin) di 5 secondi. Per ciascun parametro, il confronto statistico è stato compiuto tra il valore di controllo ed il valore di volta in volta calcolato all'interno di una finestra temporale di 30 secondi che, a partire dal bin corrispondente alla somministrazione del farmaco, veniva via via spostata in avanti a step di 5 secondi (Mann-Whitney U-test).

I neuroni sono stati considerati come responsivi al trattamento farmacologico solo quando le variazioni evidenziate nei parametri misurati sono risultate statisticamente significative per almeno 6 bin consecutivi, il primo dei quali è stato indicato come l'inizio di una risposta. In modo analogo, l'offset delle risposte è stato determinato individuando la presenza di perdita di significatività statistica durante 6 bin consecutivi. Per ciascun periodo di variazione significativa del parametro durata dei burst o del parametro frequenza dei burst sono stati calcolati la latenza, la durata e la magnitudo dell'effetto.

Tali parametri sono stati utilizzati per effettuare ulteriori paragoni statistici tra gli effetti dei differenti farmaci somministrati alle diverse concentrazioni, mediante test ANOVA seguito dal Fisher's *post hoc* test. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per P inferiore a 0.05. Se non indicato in modo diverso, tutti i risultati sono stati espressi come media \pm SD.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Sintesi degli N-valproil-L-derivati

I nuovi derivati del VPA sono stati ottenuti mediante la formazione di un legame covalente tra la funzione amminica di un L-aminoacido e la funzione carbossilica libera del farmaco.

Per la derivatizzazione del VPA sono stati scelti aminoacidi essenziali neutri appartenenti alla serie L, in quanto tali molecole possiedono dimensioni molecolari sufficientemente piccole, vengono facilmente assorbiti nel tratto gastrointestinale e presentano una funzione amminica che, legando il gruppo carbossilico del VPA, può dare luogo ad un legame peptidico (Bousquet et al. 1993; Giannola et al. 1996).

Gli L-aminoacidi selezionati in questo lavoro sono stati i seguenti: L-fenilalanina, L-triptofano, L-istidina e L-metionina.

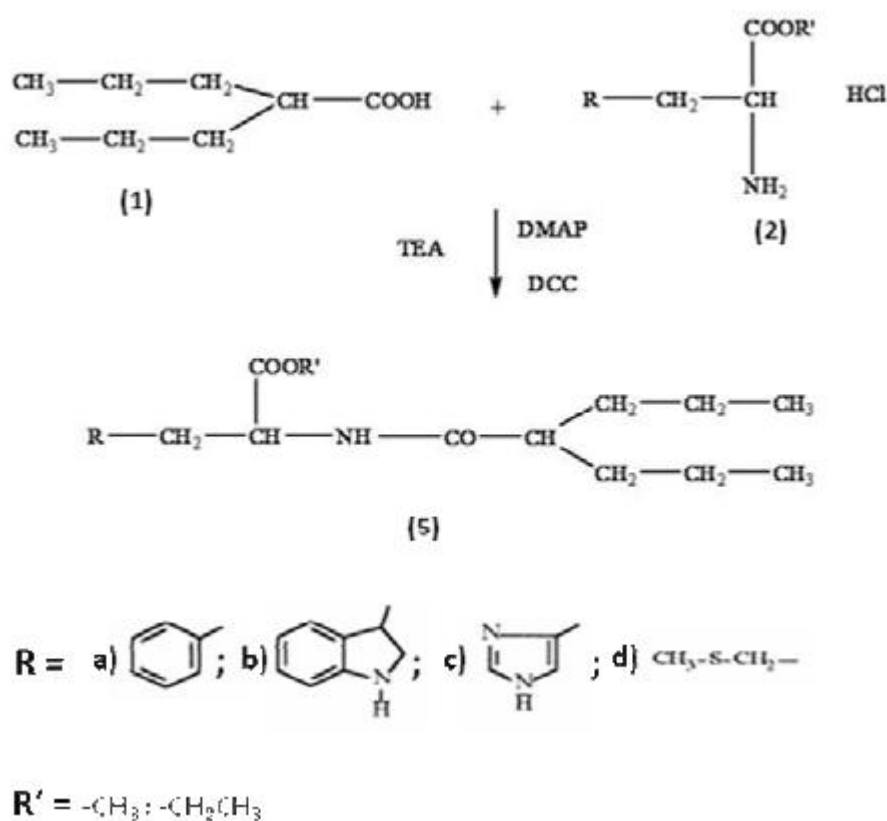
Il processo sintetico che ha consentito l'ottenimento di tutti i derivati aminoacidici del VPA si è svolto in due step. Sulla base di una procedura già descritta in letteratura (Giannola et al. 1998), ma opportunamente modificata, il primo step ha portato alla sintesi di esteri di N-valproil-L-aminoacidi; il secondo step, mediante una reazione di idrolisi, ha portato all'ottenimento dei prodotti desiderati.

Le reazioni di sintesi, per tutti i derivati ottenuti, sono state condotte a temperatura ambiente e sotto agitazione costante. Il solvente più opportuno, che ha consentito i migliori risultati, in termini di resa della reazione, è risultato essere il diclorometano; altri solventi, con polarità differente, non hanno condotto ai prodotti desiderati.

Come reagenti sono stati utilizzati L-aminoacidi protetti, a livello della loro funzione carbossilica, mediante esterificazione con un gruppo etilico o metilico, al fine di impedire

eventuali reazioni crociate tra gli aminoacidi stessi con conseguente formazione di dipeptidi nell'ambiente di reazione (Giannola et al. 1998).

Il VPA (1), è stato solubilizzato in diclorometano e posto a reagire con l'estere dell'aminoacido (2) in presenza di TEA, al fine di spostare l'equilibrio di (2) nella forma indissociata, visto che quest'ultimo si trova in commercio nella forma salificata. Di seguito, alla miscela di reazione vengono aggiunti gli agenti condensanti DCC (3) e DMAP (4). Di seguito è riportato lo schema generale della reazione di sintesi (Schema 1).



Schema 1. Sintesi degli N-valproil-L-derivati esterei

Lo schema del processo di sintesi appena descritto si differenzia da quello già noto, riportato in letteratura (Giannola et al. 1998), per l'aggiunta dell'agente condensante DMAP, nell'ambiente di reazione.

Mediante esperimenti precedenti è stato osservato, infatti, che l'utilizzo della sola DCC è associato alla formazione di prodotti secondari indesiderati. Ciò avverrebbe perché tale agente condensante si trasforma in dicicloesilurea (DCU), parzialmente solubile nell'ambiente di reazione, e, come tale, si comporta da nucleofilo, reagendo con il VPA al posto dell'aminoacido. Da tale reazione collaterale si forma la dicicloesilamide del VPA, prodotto secondario indesiderato che, da un canto, riduce la resa della reazione, e dall'altro, possedendo caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle del prodotto primario, ne ostacola l'isolamento e la purificazione.

In letteratura viene riportato infatti che, la miscela DMAP/DCC, impiegata in reazioni di dimerizzazione di molecole bioattive, è risultata utile nel ridurre la formazione di prodotti secondari (Giraud et al. 2001).

Alla luce di quanto detto, i due agenti condensanti usati in miscela, hanno avuto lo scopo di:

- attivare la funzione carbossilica del VPA verso la sostituzione nucleofila;
- preservare la chiralità dei reagenti (Slebioda et al. 1990);
- ridurre la formazione di prodotti di reazione secondari, incrementando la resa delle reazioni.

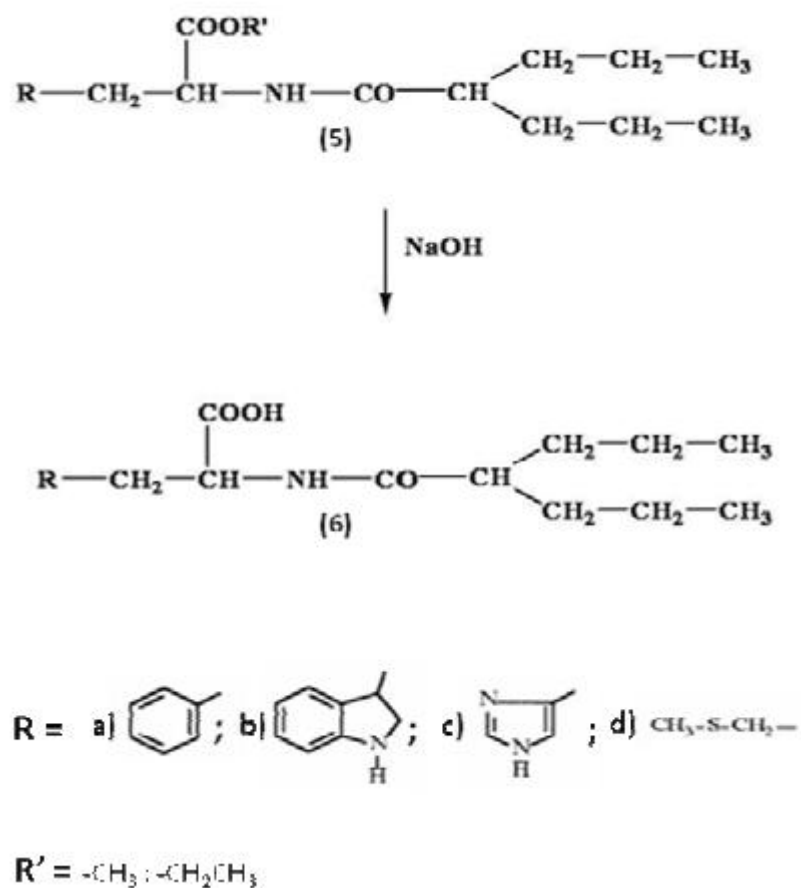
Dalle reazioni di sintesi sono stati ottenuti i seguenti prodotti: N-valproil-L-fenilalanina etil estere (**5a**), N-valproil-L-triptofano metil estere (**5b**), N-valproil-L-istidina metil estere (**5c**), N-valproil-L-metionina metil estere (**5d**).

Tutti i prodotti ottenuti sono stati purificati per successive cristallizzazioni utilizzando l'opportuno solvente.

Il secondo step del processo di sintesi è consistito in una reazione di idrolisi del gruppo estereo che protegge la funzione carbossilica della porzione aminoacidica dei derivati del VPA (**Schema 2**).

Tale reazione è stata condotta in soluzione basica per NaOH, a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per 24 ore. Mediante la reazione di idrolisi sono stati ottenuti i seguenti

derivati: N-valproil-L-fenilalanina (**6a**), N-valproil-L-triptofano (**6b**), N-valproil-L-istidina (**6c**) e N-valproil-L-metionina (**6d**).



Schema 2. Idrolisi degli N-valproil-L-derivati esterei

2. Identificazione strutturale degli N-valproil-L-derivati

Tutti i prodotti ottenuti sono stati identificati mediante spettrofotometria UV e FT-IR, spettrometria di massa accoppiata alla gas cromatografia (GC-MS) e spettrometria ^{13}C ed ^1H N.M.R.

2.1 Valproil derivati della L-fenilalanina

Il tracciato risultato dall'analisi spettrofotometrica UV dell'L-fenilalanina etil estere (**2a**) mostra tre picchi di assorbimento caratteristici a $\lambda = 252, 258$ e 263 nm riconducibili alla porzione aromatica della molecola. I tracciati dell'N-valproil-L-fenilalanina etil estere (**5a**) e dell'N-valproil-L-fenilalanina (**6a**) mantengono immutato tale andamento pur variando i valori di assorbanza specifica (ϵ) (Fig. 2). Tale comportamento indica che sia nel prodotto di sintesi (**5a**), che in quello di idrolisi (**6a**), la porzione aminoacidica aromatica è stata mantenuta.

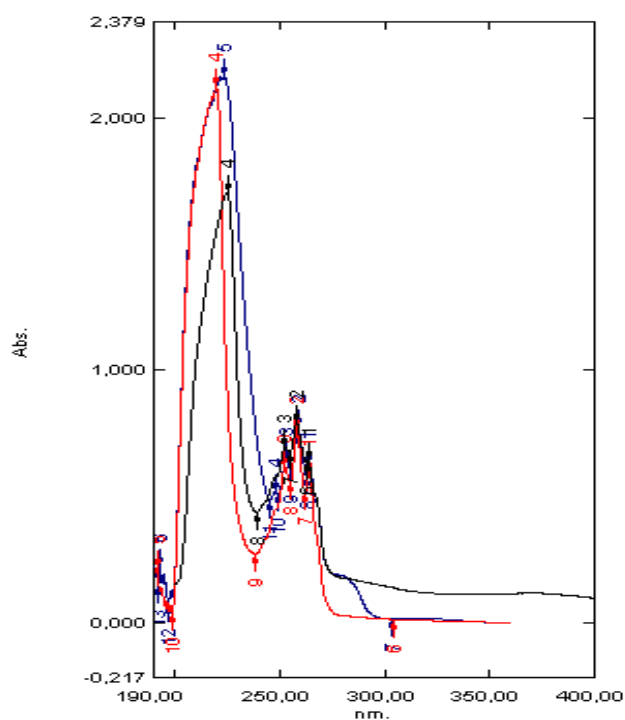


Fig. 2. Spettro UV in metanolo di: — L-Fenilalanina etil estere (**2a**) e — N-Valproil-L-Fenilalanina etil estere (**5a**) e — N-Valproil-L-Fenilalanina (**6a**)

L'analisi spettrofotometrica IR, in trasformata di Fourier, fornisce importanti indicazioni riguardo ai gruppi funzionali presenti nei prodotti di reazione. Gli spettri sono stati ottenuti per

dispersione dei campioni in Nujol e, per i derivati della L-fenilalanina **5a** e **6a**, hanno mostrato le seguenti bande (Tab. 2):

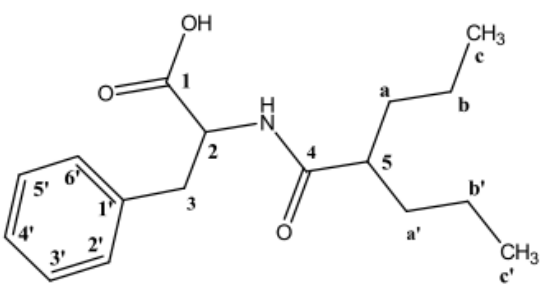
Tabella 2

Attribuzione	Frequenza (cm ⁻¹)	Frequenza (cm ⁻¹)
	<i>N</i> -Valproil-L-fenilalanina etil estere (5a)	<i>N</i> -Valproil-L-Fenilalanina (6a)
Stretching NH-amidico	3310	3293
Stretching C=O estereo	1736	
Stretching C=O carbossilico		1714
Stretching C=O amidico	1650	1646
Bending NH amidico	1531	1536

Nella tabella è possibile osservare per il composto **6a** la scomparsa della banda correlata al carbossile estereo e la contemporanea comparsa di una banda alla frequenza 1714 cm⁻¹ attribuibile alla formazione di un gruppo carbossilico libero.

L'analisi in spettrometria di massa conferma che il composto **6a** è l'*N*-valproil-L-fenilalanina. In particolare lo spettro mostra un picco molecolare avente $M/Z = 291$ (M)⁺. Inoltre la frammentazione porta alla perdita di valpromide con formazione di uno ione frammento $\text{ArCH=CH-COOH}^{\ddagger+}$ a m/z M-142. Simultaneamente il processo determina una frammentazione di tipo benzilico con formazione dello ione $\text{Ar-CH}^{\ddagger+}$ a m/z 90.

Le analisi effettuate mediante spettrometria ¹³C e ¹H N.M.R. sono state condotte utilizzando TMS come standard interno. I dati ottenuti (Tab. 3) confermano anch'essi l'ottenimento dell'*N*-Valproil-L-fenilalanina.



C-1'	138.73	C-1	174.93 (*)	C-a	36.62 (1.24, 1.46)
C-2', 6'	130.22 (7.20)	C-2	54.62 (4.71)	C-b	21.59 (1.26)
C-3', 5'	129.38 (7.22)	C-3	38.37 (2.88, 3.22)	C-c	14.46 (0.84)
C-4'	127.65 (7.18)	C-4	178.83	C-a'	36.29 (1.22, 1.42)
		C-5	47.61 (2.16)	C-b'	21.41 (0.90)
		NH	(8.12)	C-c'	14.38 (0.70)

(*) Rapidly exchangeable proton

Tab. 3. ^{13}C ed ^1H NMR (tra parentesi) chemical shifts in ppm, del derivato **6a**, relativi al CD_3OD concentrato rispettivamente a 49.00 e 3.31 ppm, rispetto al Me_4Si

2.2 Valproil derivati dell'L-triptofano

Il tracciato risultante dall'analisi spettrofotometrica UV dell' L-triptofano metil estere (**2b**) mostra due picchi di assorbimento caratteristici a $\lambda = 280$ e 289 nm riconducibili alla porzione indolica della molecola. I tracciati dell'N-valproil-L-fenilalanina etil estere (**5b**) e dell'N-valproil-L-fenilalanina (**6a**) mantengono immutato tale andamento pur variando i valori di assorbenza specifica (ϵ) (Fig. 3). Tale comportamento indica che sia nel prodotto di sintesi (**5b**) che in quello di idrolisi (**6b**) la porzione aminoacidica è stata mantenuta.

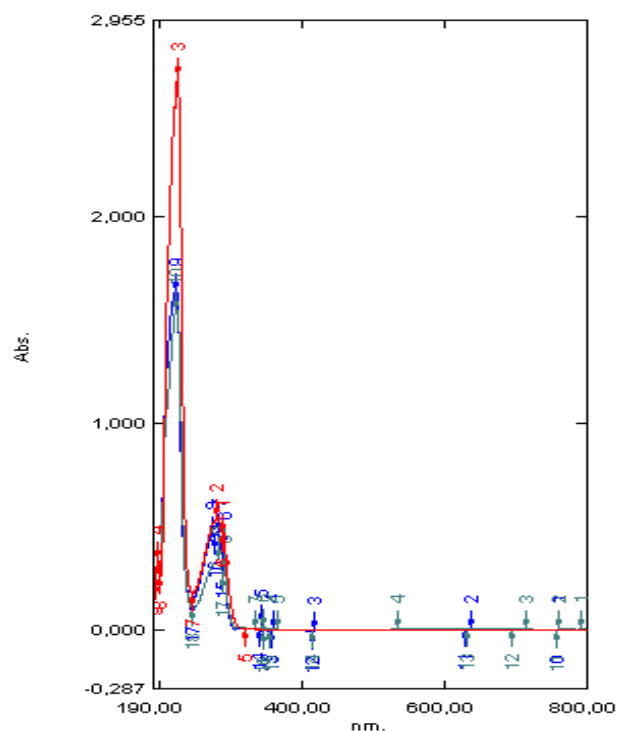


Fig. 3. Spettro UV in metanolo di: — L-Triptofano-metil estere (2b) e
— N-Valproil-L-Triptofano-metil estere (5b) — N-Valproil-L-Triptofano- (6b)

L'analisi spettrofotometrica IR, in trasformata di Fourier, dei Valproil-derivati del triptofano ha evidenziato la presenza dei gruppi funzionali caratteristici, come mostrato in Tabella 4:

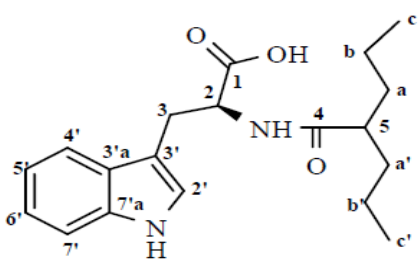
Tabella 4

Attribuzione	Frequenza (cm ⁻¹) N-Valproil-L-triptofano metil estere (5b)	Frequenza (cm ⁻¹) N-Valproil-L-Triptofano (6b)
Stretching NH-amidico	3249	3283
Stretching NH- indolico	3385	3386
Stretching C=O estereo	1732	
Stretching C=O carbossilico		1712
Stretching C=O amidico	1656	1648
Bending NH amidico	1518	1534

Anche in questo caso nella tabella è possibile evidenziare per il composto **6b** la scomparsa della banda correlata al carbossile estereo e la contemporanea comparsa di una banda alla frequenza 1712 cm^{-1} , attribuibile alla formazione di un gruppo carbossilico libero.

L'analisi in spettrometria di massa conferma che il composto **6b** è l'N-valproil-L-triptofano. In particolare, lo spettro mostra un picco molecolare avente $M/Z = 330\text{ (M)}^+$. Inoltre, la frammentazione porta alla perdita di valpromide con formazione di uno ione frammento ArCH=CH-COOH^+ a $m/z\text{ M-142}$. Simultaneamente, il processo determina una frammentazione di tipo benzilico con formazione dello ione Ar-CH^+ a $m/z\text{ 129}$.

Le analisi effettuate mediante spettrometria ^{13}C e ^1H N.M.R. sono state condotte utilizzando TMS come standard interno. I dati ottenuti (Tab. 5) confermano anch'essi l'ottenimento dell'N-Valproil-L-triptofano.



C-2'	124.45 (7.10)	C-1	175.39	C-a	36.55 (1.24, 1.44)
C-3'	111.27	C-2	54.12 (4.80)	C-b	21.58 (1.26)
C-3'a	128.68	C-3	28.55 (3.10, 3.35)	C-c	14.49 (0.85)
C-4'	119.27 (7.58)	C-4	178.73	C-a'	36.25 (1.20, 1.44)
C-5'	119.76 (7.00)	C-5	47.54 (2.18)	C-b'	21.38 (0.90)
C-6'	122.35 (7.08)	NH	(8.05)	C-c'	14.38 (0.70)
C-7'	112.26 (7.32)	COOH	(*)		
C-7'a	138.03				
N(1')H	(10.35)				

(*) Rapidly exchangeable proton

Tab. 5. ^{13}C ed ^1H NMR (tra parentesi) chemical shifts in ppm, del derivato **6b**, relativi al CD_3OD centrato rispettivamente a 49.00 e 3.31 ppm, rispetto al Me_4Si

2.3 Valproil derivati della L-Istidina

La molecola sintetizzata non presenta gruppi cromofori rilevabili mediante spettrofotometria UV, mentre l'analisi spettrofotometrica IR, in trasformata di Fourier, dei Valproil-derivati dell'L-istidina ha evidenziato la presenza dei gruppi funzionali caratteristici, come mostrato in Tabella 6:

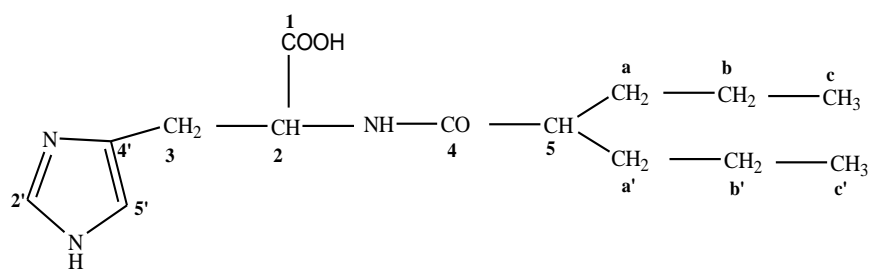
Tabella 6

Attribuzione	Frequenza (cm ⁻¹)	Frequenza (cm ⁻¹)
	<i>N</i> -Valproil-L-istidina metil estere (5c)	<i>N</i> -Valproil-L-istidina (6c)
Stretching NH-amidico	3305	3159
Stretching C=O estereo	1753	
Stretching C=O carbossilico		
Stretching C=O amidico	1644	1648
Bending NH amidico	1539	1542

Rispetto agli altri derivati della serie, la *N*-Valproil-L-istidina non presenta segnali intorno a 1700 cm⁻¹; tale comportamento si giustifica ammettendo che la molecola, possedendo ancora un azoto basico, può trovarsi nella forma zwitterionica.

L'analisi in spettrometria di massa conferma la struttura dell'*N*-valproil-L-istidina non presenta segnali (**6c**). Anche in questo caso, si ha un picco molecolare avente $M/Z = 281$ (M)⁺. L'andamento della frammentazione è in accordo con la presenza, nella molecola, sia della porzione aminoacidica che di quella valproidica.

Le analisi effettuate mediante spettrometria ¹³C e ¹H N.M.R. sono state condotte utilizzando TMS come standard interno. I dati ottenuti (Tab. 7) confermano anch'essi l'ottenimento dell'*N*-Valproil-L-istidina:



C-1	179.00	C-a	36.63 (1.28, 1.50)
C-2	52.82 (4.61)	C-b	21.63 (1.30)
C-3	29.50 (3.04, 3.22)	C-c	14.50 (0.88)
NH	(8.40)	C-a'	36.63 (1.27, 1.47)
C-4	177.48	C-b'	21.63 (1.08)
C-5	47.83 (2.22)	C-c'	14.50 (0.85)
C-2'	135.20 (8.40)		
C-4'	132.99		
C-5'	118.73 (7.16)		

Tabella 7. ¹³C ed ¹H NMR (tra parentesi) chemical shifts in ppm, del derivato 6c, relativi al CD₃OD centrato rispettivamente a 49.00 e 3.31 ppm, rispetto al Me₄Si

2.4. Valproil derivati della L-metionina

La molecola sintetizzata non presenta gruppi cromofori rilevabili mediante spettrofotometria UV, mentre l'analisi spettrofotometrica IR, in Trasformata di Fourier, dei Valproil-derivati dell'L-metionina ha evidenziato la presenza dei gruppi funzionali caratteristici, come mostrato in Tabella 8.

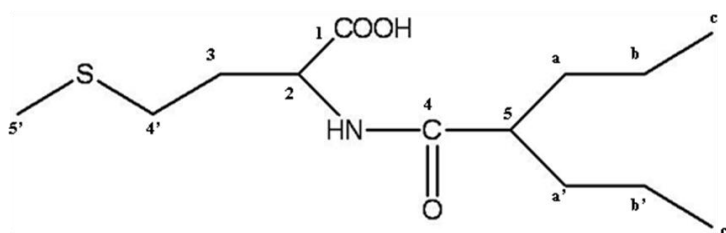
Tabella 8

Attribuzione	Frequenza (cm ⁻¹)	Frequenza (cm ⁻¹)
	<i>N</i> -Valproil-L-metionina metil estere (5d)	N-valproil-L-metionina (6d)
Stretching NH-amidico	3296	3291
Stretching C=O estereo	1730	
Stretching C=O carbossilico		1715
Stretching C=O amidico	1635	1644
Bending NH amidico	1543	1536

Anche in questo caso nella tabella è possibile evidenziare per il composto **6d** la scomparsa della banda correlata al carbossile estereo e la contemporanea comparsa di una banda alla frequenza 1715 cm⁻¹ attribuibile alla formazione di un gruppo carbossilico libero.

L'analisi in spettrometria di massa conferma la struttura dell'*N*-valproil-L-metionina (**6d**). Anche in questo caso, si ha un picco molecolare avente $M/Z = 276$ (M)⁺. L'andamento della frammentazione è in accordo con la presenza, nella molecola, sia della porzione aminoacidica che di quella valproidica.

Le analisi effettuate mediante spettrometria ¹³C e ¹H N.M.R. sono state condotte utilizzando TMS come standard interno. I dati ottenuti (Tab. 9) confermano anch'essi l'ottenimento dell'*N*-Valproil-L-metionina:



C-1	177.0 (*)	C-a,a'	32.9 (1.53)
C-2	56.7 (4.46)	C-b,b'	19.9 (1.33)
C-3	32.9 (2.15)	C-c,c'	13.6 (0.96)
NH	(8.00)		
C-4	178.5		
C-5	42.6 (2.42)		
C-4'	29.6 (2.44)		
C-5'	16.8 (2.09)		

Tab. 9. ^{13}C ed ^1H NMR (tra parentesi) chemical shifts in ppm, del derivato 6d, relativi al CD_3OD centrato rispettivamente a 49.00 e 3.31 ppm, rispetto al Me_4Si

3. Determinazione del coefficiente di distribuzione $D^{\text{pH}7.4}$ degli N-valproil-L-derivati

In questo lavoro, è stato calcolato il Log D per tutti i derivati aminoacidici del VPA che sono stati sintetizzati, utilizzando *n*-ottanolo, come fase oleosa, e tampone fosfato a pH 7.4, come fase acquosa, secondo la metodica precedentemente riportata. I valori di Log D ottenuti sono riportati in Tabella 10 e, per ciascun derivato, sono espressi come media, effettuata sui valori ottenuti da tre esperimenti.

Tabella 10

<i>N-valproil-L-derivati esterei</i>	<i>Log D</i>	<i>N-valproil-L-derivati</i>	<i>Log D</i>
N-valproil-L-fenilalanina etil estere	1.38	N-valproil-L-fenilalanina	0.19
N-valproil-L-triptofano metil estere	0.62	N-valproil-L-triptofano	0.3
N-valproil-L-istidina metil estere	0.038	N-valproil-L-istidina	-1.61
N-valproil-L-metionina metil estere	0.96	N-valproil-L-metionina	-1.0

I valori di Log D degli N-valproil-L-derivati esterei mostrano una prevalente lipofilia giustificabile con il fatto che la coniugazione del VPA con un aminoacido determina un incremento delle dimensioni molecolari del farmaco e che la presenza del gruppo protettore sulla funzione carbossilica dell'aminoacido riduce la capacità di ripartirsi nella fase acquosa.

Osservando i valori di Log D riportati per gli N-valproil-L-derivati, è possibile notare che questi presentano una lipofilia inferiore rispetto ai corrispondenti esteri, probabilmente grazie alla presenza del gruppo carbossilico libero. In particolare, i derivati N-valproil-L-fenilalanina e N-valproil-L-triptofano presentano, rispettivamente, valori di Log D pari a 0.19 e 0.3, adeguati per il raggiungimento del CNS. Infatti, per raggiungere tanto il cervello che l'intestino, un farmaco dovrebbe avere un valore di Log D superiore a 0 ed inferiore a 3 (Pajouhesh and Lenz, 2005).

Per i derivati N-valproil-L-istidina ed N-valproil-L-metionina si osservano valori di Log D negativi, indice di una prevalente idrofilia. Ciò non stupisce per ciò che concerne il derivato dell'istidina poiché il prodotto che si ottiene è sottoforma di cloridrato. Meno giustificabile è il valore ottenuto per l'N-Valproil-L-metionina, rimane però la considerazione che una maggiore idrofilia si traduce in una maggiore solubilità, caratteristica comunque favorevole per la somministrabilità. Inoltre, c'è ancora da considerare che il parametro Log D non deve essere

considerato come a se stante ed obbligatorio nella predizione dell'uptake da parte del SNC di un farmaco, ma deve essere correlato ad altri parametri predittivi (Fagerholm, 2007).

4. Valutazione della stabilità degli N-valproil-L-derivati

4.1. Valutazione della stabilità chimica

Rispetto ad altre vie di somministrazione, quella orale rimane la preferita, in quanto è quella più semplice ed incontra la compliance del paziente. Tuttavia, il transito del farmaco attraverso il tratto gastrointestinale può costituire un fattore limitante per la biodisponibilità, come conseguenza della sua degradazione, correlata al pH dell'ambiente.

D'altra parte, la via parenterale necessita della solubilizzazione preliminare del farmaco e la sua stabilizzazione nei fluidi fisiologici, quali l'acqua sterile o le soluzioni tampone. Pertanto, sono stati effettuati studi sulla stabilità chimica dei composti sintetizzati, in vista di una loro eventuale somministrazione.

La stabilità chimica degli N-valproil-L-derivati (**6a**, **6b**, **6c**, **6d**) è stata valutata mediante esperimenti *in vitro*, svolti in condizioni sperimentali simulanti quelle dei fluidi biologici (soluzioni tampone con pH compreso nel range 1.2 - 8.0, T= 37°C).

La valutazione della stabilità chimica dei composti **6a** e **6b** è stata effettuata sia mediante analisi spettrofotometrica UV, che analisi cromatografica HPLC, mentre per **6c** e **6d** solo con analisi cromatografica HPLC.

Per i composti **6a** e **6b**, è stato osservato che essi presentano una scarsissima solubilità a pH 1.2, tale da non essere quantificabili con le tecniche sopracitate. Pur mantenendo tali composti in ambiente acquoso a pH 1.2 per 24 h non si assiste alla comparsa di alcun composto nelle successive analisi. Tale risultato porta alla considerazione che i composti **6a** e **6b** non passando in soluzione non possono neanche essere assorbiti a livello gastrico.

Gli esperimenti condotti a pH 6.5, 7.2 e 8.0 hanno mostrato che entrambi i derivati risultano stabili in soluzione e che il legame peptidico non viene scisso, in quanto non si osserva la comparsa di VPA o di aminoacido libero.

Di seguito sono riportati i profili di assorbimento UV-Vis, nel range di lunghezza d'onda 200-800 nm, delle soluzioni acquose, ai diversi valori di pH, di **6a** (Fig. 4 a, b, c), registrati ogni 30 minuti per una durata complessiva di 24 h. Gli spettri delle soluzioni mostrano i caratteristici massimi di assorbimento alle λ di 252, 258 e 263 nm. Dalla sovrapposizione dei tracciati si osserva, che, tale andamento rimane invariato per tutta la durata degli esperimenti sia in termini di assorbanza, che di rapporto tra i picchi, suggerendo elevata stabilità del composto.

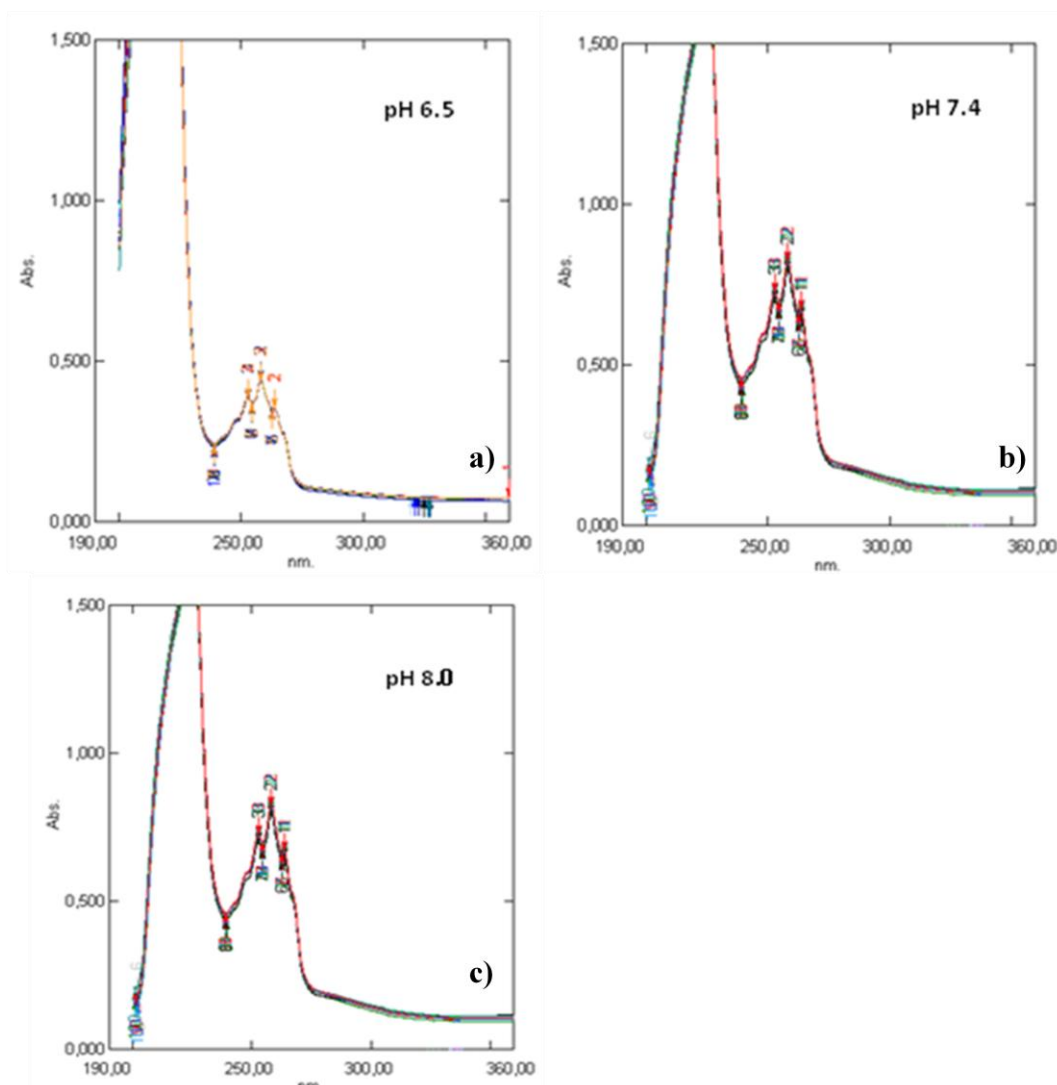


Fig. 4 a, b e c. Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del composto 6a(1mg/ml) a pH 6.5, 7.4 e 8.0

Lo stesso comportamento è stato osservato per il composto **6b**, per il quale è stato monitorato nel tempo, l'andamento dei caratteristici massimi di assorbimento alle λ di 289 e 279 nm (Fig. 5 a, b, c).

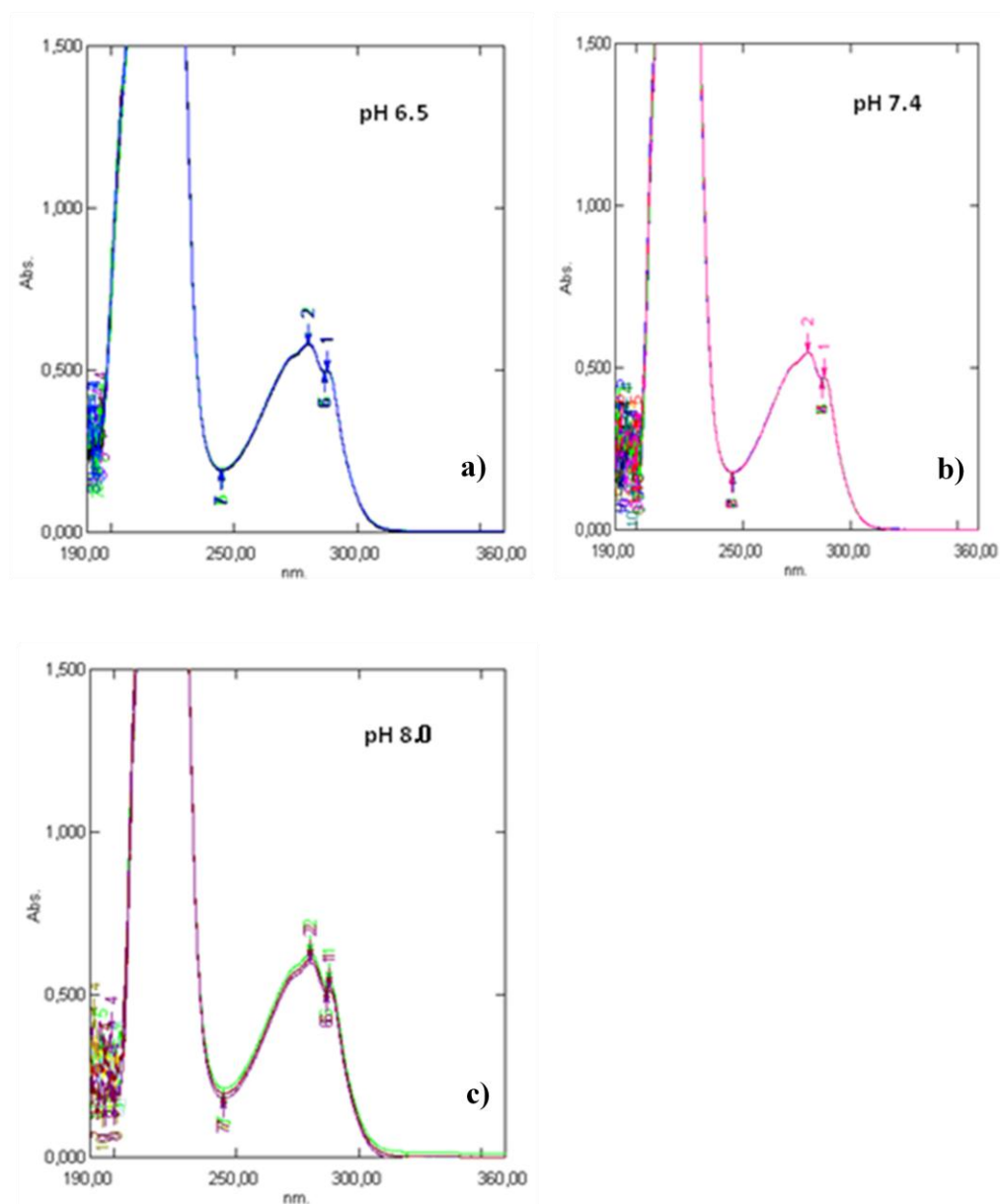


Fig. 5 a, b, c. Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del composto 6b (0.04 mg/ml) a pH 6.5, 7.4 e 8.0

Contemporaneamente, per i composti **6a** e **6b**, è stata effettuata un'analisi HPLC dei campioni prelevati ai medesimi intervalli di tempo, che ha evidenziato che la concentrazione di entrambi i

derivati del VPA rimane invariata e non vi è comparsa di picchi relativi a nuove specie, potenzialmente frutto di fenomeni degradativi. Tale comportamento è rimasto costante nell'arco di 24 ore, dimostrando l'elevata stabilità chimica dei composti **6a** e **6b**, alle diverse condizioni di pH simulanti i fluidi biologici del tratto intestinale.

La stabilità chimica dei composti **6c** e **6d** è stata valutata esclusivamente mediante analisi HPLC dei campioni prelevati (ogni 30 minuti nell'arco di 24 h) da soluzioni ai valori di pH nel range 1.2 – 8.0.

Anche per questi due derivati aminoacidici del VPA, è stato osservato un comportamento analogo a quelli mostrati dai composti **6a** e **6b**. Infatti, **6c** e **6d** non hanno subito alcuna variazione di concentrazione durante gli esperimenti condotti e nei cromatogrammi registrati non è stata osservata la comparsa di picchi attribuibili a nuove specie formatesi dall'eventuale degradazione dei composti.

Tali evidenze sperimentali hanno suggerito, anche in questo caso, che **6c** e **6d** presentano un'elevata stabilità chimica, ai diversi valori di pH simulanti i fluidi biologici del tratto gastrointestinale.

4.2. Valutazione della stabilità enzimatica

In plasma umano. La stabilità nel sangue di molecole a potenziale attività terapeutica gioca un ruolo di fondamentale importanza nella scoperta e nello sviluppo di un farmaco; la sua stabilità nel plasma è essenziale, infatti, per mantenere ottimale sia la sua concentrazione che l'emivita plasmatica, sia per il raggiungimento dell'effetto farmacologico. Composti instabili a livello plasmatico tendono, infatti, ad avere una rapida clearance, una emivita breve ed una scarsa performance *in vivo* (Di et al. 2005). I derivati **6a**, **6b**, **6c** e **6d**, dal momento che contengono un legame amidico nella loro struttura, potrebbero essere suscettibili a degradazione da parte degli enzimi contenuti nel sangue.

In questo lavoro, sono stati condotti esperimenti di stabilità enzimatica *in vitro* utilizzando plasma umano, al fine di valutare il comportamento degli N-valproil-L-derivati in tale mezzo.

I composti **6a**, **6b**, **6c** e **6d** sono stati incubati in aliquote di plasma umano e, ad opportuni intervalli di tempo, sono stati prelevati campioni che, di volta in volta, sono stati analizzati mediante HPLC. La valutazione della stabilità plasmatica è stata effettuata per un arco di 24 h. Dai cromatogrammi HPLC registrati, si osserva che non vi è variazione di concentrazione dei composti analizzati e non si riscontra la presenza di picchi relativi a nuove specie originatesi dalla scissione del legame peptidico. Da ciò si deduce che tutti i derivati sono stabili in plasma umano e che, per tutta la durata degli esperimenti, non subiscono alcuna degradazione.

In omogenato di cervello di ratto. Esperimenti di stabilità enzimatica sono stati condotti al fine di valutare il comportamento degli N-valproil-L-derivati in ambiente cerebrale in presenza del relativo corredo enzimatico. I composti **6a**, **6b**, **6c** e **6d** sono stati incubati in omogenato di cervello di ratto e, anche in questo caso, ad opportuni intervalli di tempo, sono stati prelevati campioni che, di volta in volta, sono stati analizzati mediante HPLC.

La concentrazione di **6a**, **6b**, **6c** e **6d** è rimasta costante per tutta la durata degli esperimenti, rivelando l'elevata stabilità posseduta da tali derivati in ambiente cerebrale dopo 24 ore di incubazione.

5. Studio elettrofisiologico: valutazione dell'attività antiepilettica degli N-valproil-L-derivati in un modello sperimentale di epilessia ippocampale in vitro nel ratto

Al fine di valutare l'attività antiepilettica degli N-valproil-L-derivati è stato scelto un modello sperimentale di epilessia ippocampale *in vitro* nel ratto.

Tale modello è risultato idoneo allo scopo di questa ricerca, in quanto consente una valutazione diretta dell'attività antiepilettica di una molecola, escludendo variabili quali, ad esempio, il passaggio attraverso la BBB o il metabolismo a carico di altri organi.

Al fine di validare la metodica e il modello sperimentale adottati, è stato somministrato, in un primo momento, il VPA. L'effetto di tale farmaco sulla riduzione dell'attività parossistica è stato valutato scegliendo concentrazioni pari a 0.5, 1.0 e 2.0 mM. Inoltre, tutti i trattamenti hanno avuto una durata di 15 minuti. Le dosi e i tempi di somministrazione del VPA sono stati stabiliti prendendo in considerazione alcuni studi riportati in letteratura, riguardanti i tempi di equilibrio aCSF – fetta nonché gli effetti indotti dal VPA e da alcuni derivati di tale farmaco in modelli sperimentali simili a quello utilizzato in questa ricerca (Sokolova et al.1998; Armand et al. 1998).

Per valutare l'efficacia degli N-valproil-L-derivati nel modello sperimentale adottato, questi sono stati somministrati, inizialmente, ad una concentrazione pari a 1.0 mM, corrispondente alla concentrazione intermedia utilizzata per il VPA. Dal momento che, già a tale dose, il derivato **6b**, primo ad essere preso in esame, ha mostrato una discreta capacità nella riduzione dell'attività parossistica, è sembrato utile somministrare dosi inferiori rispetto alla precedente. In particolare, l'efficacia di **6b** è stata valutata somministrando concentrazioni pari a 0.2, 0.5 e 1.0 mM. Anche in questo caso, al fine di poter effettuare un confronto con l'attività del VPA, tutti i trattamenti hanno avuto una durata di 15 minuti.

I farmaci impiegati sono stati solubilizzati in aCSF modificato e sono stati somministrati mediante perfusione della fetta con tale mezzo, soltanto dopo avere ottenuto una registrazione extracellulare stabile.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti seguendo il protocollo descritto nella parte sperimentale. L'incubazione delle fettine di encefalo di ratto in aCSF modificato determina generalmente, dopo circa 90 minuti, l'insorgere di un'attività spontanea epilettica sottoforma di burst, caratterizzata da una particolare morfologia di eventi singoli (Sokolova et al. 1998). In particolare, si osserva uno shift del potenziale di base in DC a cui si sovrappongono ripetuti spike

di popolazione composti da scariche neuronali sincronizzate (Fig. 6). L'attività parossistica comincia con un burst di campo in cui le scariche degli spike di popolazione sono irregolari e mostrano variazioni istantanee sia in frequenza che in ampiezza. Questi sono di solito rimpiazzati da spike di popolazione regolari di alta ampiezza. Tale attività è stata caratterizzata da due parametri: la frequenza dei burst e la durata dei burst. In condizioni di controllo, è stato possibile osservare burst con una frequenza media di $57,62 \pm 48,03$ Hz ($n = 71$) ed una durata media di $293,37 \pm 274,37$ msec.

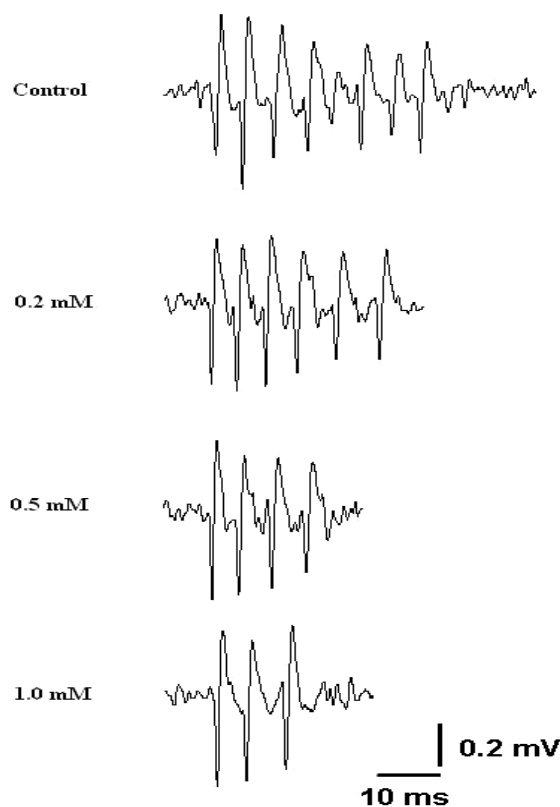


Fig. 6. Effetti dell'N-valproil-L-triptofano (6b) a varie concentrazioni (0.2, 0.5, 1.0 mM) sulla morfologia e sulla durata dei burst indotti dalla perfusione della fetta con aCSF modificato

Durante lo studio che ha paragonato l'attività del derivato **6b** con quella del VPA, la registrazione dell'attività elettrica è stata effettuata da 71 fette di cervello, a livello dell'area CA1 dell'ippocampo. Alcune fettine sono state perfuse con aCSF modificato contenente VPA, alle concentrazioni di 0.5 (n=11), 1.0 (n=16) e 2 mM (n=14) ed altre con aCSF modificato contenente composto **6b**, alle concentrazioni di 0.2 (n = 11), 0.5 (n = 9) e 1 mM (n = 10).

La perfusione ha determinato un effetto inibitorio sulla durata e sulla frequenza dei burst. Gli effetti rispettivi del VPA e del derivato **6b** su entrambi i parametri, alle differenti dosi somministrate, vengono descritti (Tabelle 11 e 12) tenendo in considerazione il numero delle fette responsive al trattamento farmacologico (*n*), il periodo di *latenza* dell'effetto del farmaco, la durata dell'effetto (*span*) e l'intensità dell'effetto, espressa in termini di differenza percentuale del trattamento rispetto al controllo (*magnitudo*).

Nel modello di epilessia ippocampale in vitro, impiegato durante tale ricerca, la coniugazione del VPA con l'L- triptofano, ha incrementato marcatamente l'effetto protettivo contro le scariche ippocampali rispetto all'effetto anticonvulsivante esercitato dal solo VPA.

Il trattamento effettuato con **6b** alla dose più bassa, pari a 0.2 mM, non ha mostrato differenze significative se paragonato ad altri trattamenti effettuati con VPA, eccetto che per un incremento della durata dell'effetto inibitorio sulla frequenza di scarica, significativamente maggiore rispetto al trattamento con VPA alla concentrazione 0.5 mM (Tab. 11).

Al contrario, i dati ottenuti dalla somministrazione di **6b** alla dose 1 mM, hanno mostrato una buona efficacia di quest'ultima, rivelando un incremento significativo della durata degli effetti inibitori sia sulla frequenza di scarica (Tab. 11), sia sulla durata (Tab. 12) dei burst ippocampali. Inoltre, tale dosaggio ha avuto una maggiore azione in relazione all'intensità dell'effetto (*magnitudo*), sia sulla frequenza di scarica che sulla durata dei burst, ed ha avuto un'efficacia significativamente superiore a quella del VPA alle dosi di 0.5 mM e 2 mM (Tab. 11 e 12).

In definitiva, l'analisi del periodo di inibizione dei burst ha rivelato un effetto anticonvulsivante più pronunciato del derivato **6b**, persino alle dosi più basse. Per esempio, al

dosaggio di 0.5 mM, è stato possibile osservare un effetto inibitorio più duraturo, sia nei confronti della frequenza di scarica, sia della durata dei burst, seppure con una magnitudo inferiore (Tab. 11 e 12).

Tabella 11. Effetto del VPA e del derivato 6b sulla frequenza di scarica dei burst

Treatment	n.	Latency (min)	Span (min)	Magnitudo (%)
VPA				
0.5 mM	5 (45,5%)	18,19 ± 13,78	20,13 ± 18,63	-39.73 ± 17.29
1 mM	7 (43,8%)	14,43 ± 9,97	19,02 ± 16,94	-44.93 ± 26.50
2 mM	6 (42,9%)	19,13 ± 12,33	12,46 ± 12,60	-37.43 ± 14.03
6b				
0.2 mM	7 (63,6%)	14,58 ± 6,03	38,80 ± 14,44	-52.99 ± 24.73
0.5 mM	8 (88,9%)	16,80 ± 13,26	51,99 ± 40,13	-46.89 ± 23.17
1 mM	3 (30,0%)	10,20 ± 10,19	64,88 ± 50,84	-63.61 ± 18.90

* = differenza statistica significativa con P <0.05;

Tabella 12. Effetto del VPA e del derivato 6b sulla durata di un singolo burst

Treatment	n.	Latency (min)	Span (min)	Magnitudo (%)
VPA				
0.5 mM	5 (45,5%)	22,40 ± 19,53	40,83 ± 31,09	-35.57 ± 20.73
1 mM	7 (43,8%)	18,06 ± 14,06	31,62 ± 24,58	-43.54 ± 21.62
2 mM	3 (21,4%)	14,51 ± 6,78	22,97 ± 18,19	-34.62 ± 19.01
6b				
0.2 mM	5 (45,5%)	12,37 ± 6,34	34,28 ± 19,59	-45.68 ± 29.80
0.5 mM	3 (33,3%)	8,31 ± 5,45	54,20 ± 42,06	-29.49 ± 21.09
1 mM	4 (40,0%)	15,46 ± 7,08	51,69 ± 39,21	-62.42 ± 24.89

* = differenza statistica significativa con P <0.05

CONCLUSIONI

La ricerca svolta durante il triennio del Dottorato di Ricerca ha condotto all'ottenimento di nuovi derivati aminoacidici del VPA. Le reazioni di sintesi condotte in questo studio hanno consentito la coniugazione del farmaco con aminoacidi essenziali neutri della serie L e per tutti gli N-valproil-L-derivati sono state ottenute buone rese di reazione. Sono stati impiegati i seguenti aminoacidi: L-fenilalanina, L-triptofano, L-istidina e L-metionina. La sintesi dei derivati del VPA è stata seguita dalla caratterizzazione degli stessi.

Essendo la lipofilia una caratteristica chimico-fisica che può condizionare il processo di permeazione di un farmaco all'interno del CNS, per tutti gli N-valproil-L-derivati, è stato calcolato il Log D, parametro utile ai fini della valutazione della natura di una molecola. In particolare, per i derivati **6a** e **6b**, è stato osservato che il Log D ha un valore adeguato per l'uptake nel CNS, secondo quanto viene riportato in letteratura; per i derivati **6c** e **6d**, invece, sono stati osservati valori di Log D negativi, coerenti con una natura prevalentemente idrofila di tali derivati. Tuttavia, tale dato indica anche una maggiore solubilità degli stessi, importante ai fini della somministrabilità.

Sono stati condotti, inoltre, studi finalizzati alla valutazione della stabilità chimica dei nuovi derivati del VPA in soluzioni tampone a diversi valori di pH, simulanti i fluidi biologici del tratto gastrointestinale. Nel corso di tutti gli esperimenti, gli N-valproil-L-derivati hanno mostrato un'elevata stabilità, lasciando ipotizzare, la possibilità di un'eventuale loro somministrazione, tanto per via orale, che per via parenterale.

Studi di stabilità enzimatica, condotti sia in plasma umano che in omogenato di cervello di ratto, hanno rivelato che tutti i derivati sintetizzati presentano un'elevata stabilità, anche in tali ambienti ed in presenza dei rispettivi corredi enzimatici.

Studi elettrofisiologici, condotti utilizzando un modello sperimentale di epilessia ippocampale *in vitro* nel ratto, hanno consentito di osservare che la somministrazione del derivato **6b**, persino alle dosi più basse, determina un marcato incremento dell'effetto protettivo contro le scariche ippocampali, rispetto a quello indotto dal VPA nel medesimo modello sperimentale.

La somministrazione del derivato **6b** alla concentrazione 1 mM è risultata la più efficace in termini di riduzione sia della frequenza che della durata dei burst. Inoltre, l'effetto anticonvulsivante esplicito da **6b**, a tale concentrazione, ha avuto una durata maggiore rispetto a quello indotto da tutte le dosi di VPA saggate nel modello sperimentale utilizzato.

Una discreta efficacia nella riduzione delle scariche parossistiche ippocampali è stata osservata somministrando anche un secondo derivato, il composto **6a**. L'analisi statistica relativa ai dati sperimentali ottenuti è attualmente in corso.

Inoltre, sono in corso ulteriori esperimenti finalizzati a valutare, nel modello sperimentale adottato, l'attività anticonvulsivante posseduta dai derivati **6c** e **6d**.

Con la prospettiva di studiare eventuali effetti sistemici indotti dagli N-valproil-L-derivati sintetizzati durante questa ricerca, in futuro, questi ultimi verranno testati scegliendo un opportuno modello sperimentale di epilessia *in vivo* nel ratto.

RINGRAZIAMENTI

E' difficile per me esprimere, attraverso poche righe, il senso di gratitudine che provo nei confronti delle numerose persone che hanno contribuito in modo determinante allo svolgimento della mia ricerca.

I miei ringraziamenti sono rivolti, innanzitutto, al Prof. Vittorio La Grutta, al Prof. Giuseppe Ferraro e al Prof. Pierangelo Sardo per gli insegnamenti ricevuti e per la costanza con la quale, giorno dopo giorno, mi hanno guidata in questo percorso di formazione scientifica. E' difatti, grazie al Loro prezioso contributo, che mi è stato possibile attuare la sperimentazione di carattere elettrofisiologico che costituisce parte fondamentale di questo studio.

Altrettanto vivamente ringrazio il Prof. Libero Italo Giannola e la Dott.ssa Viviana De Caro che, guidando i miei studi, sin dalla tesi di laurea, mi hanno accompagnato con dedizione anche durante il triennio di Dottorato, contribuendo allo svolgimento della ricerca per quanto concerne lo studio di carattere chimico-farmaceutico.

Un ringraziamento sentito va ai miei colleghi, al Dott. Fabio Carletti, al Dott. Valerio Rizzo e al Dott. Gioacchino Lonobile. Con loro ho condiviso giorno per giorno questo cammino, ricevendo, grazie alla loro esperienza ed amicizia, una forte motivazione nello svolgere e portare a termine questo percorso di crescita, umana e scientifica.

BIBLIOGRAFIA

Abraham M.H., Chada S., Mitchell R., Hydrogen bonding. 33. Factors that influence the distribution of solutes between blood and brain, *J. Pharm. Sci.*, 83, 1257-1268, **1994**.

Anderson B.D., Pro-drugs for improved CNS delivery, *Advanced Drug delivery Reviews*, 19, 171-202, **1996**.

Armand V., Louvel J., Pumain R., Heinemann U., Effects of new valproate derivatives on epileptiform discharges induced by pentylenetetrazole or low Mg^{+2} in rat enthorinal cortex-hippocampus slices, *Epilepsy Research* 32, 345-355, **1998**.

Avanzini G., Fariello R., Heinemann U., Mutani R., Current problems in epilepsy, Epileptogenic and Excitotoxic Mechanisms, Ed. John Libbey, 8, 17-27, **1993**.

Avanzini, S. and Franceschetti, S., Cellular biology of epileptogenesis, *The Lancet Neurology*, 2, 33-42, **2003**.

Bialer, M., Walker, M.C., Sander, J.W.S., Pros and cons for the development of new antiepileptic drugs, *CNS Drugs*, 16, 285–289, **2004**.

Bialer, M., New antiepileptic drugs that are second generation to existing antiepileptic drugs, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 15, 637–647, **2006**.

Bialer M. and Yagen B., Valproic Acid: Second Generation, *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4, 130-137, **2007**.

Bousquet E., De Regis M., Giannola L.I., Santagati N.A., Tirendi S., Synthesis, characterisation and in vitro hydrolysis of L-pyroglutamyl-L-tryptophan derivatives as potential drug carriers, *Pharmazie*, 48, 260-262, **1993**.

Canger R., Le epilessie oggi, Basi neurobiologiche dell'epilettogenesi, 2, Quarta edizione, Masson, **1999**.

Carelli V., Liberatore F., Scipione L., Impicciatore M., Barocelli E., Cardellini M., Giorgioni G., New systems for the specific delivery and sustained release of dopamine to the brain, *J. Control. Rel.*, 42, 209-216., **1996**.

Clementi F., Fumagalli G., Farmacologia generale e molecolare, Ed. UTET, **2000**.

Crivori P., Cruciani G., Carrupt P.A., Testa B., Predicting blood–brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure, *J. Med. Chem.*, 43, 2204–2216, **2000**.

De Caro, V., Giandalia, G., Siragusa, M.G., Lamartina, L., Friscia, S., Sardo, P., Carletti, F., Rizzo, V., Ferraro, G., Giannola L.I., N-Valproyl-L-Tryptophan for CNS-Targeting: Synthesis, Characterization and Efficacy In Vitro Studies of a New Potential Antiepileptic Drug, *Medicinal Chemistry*, 7, 9-17, **2011**.

De Vries H.E., Kuiper J., De Boer A.G., Van Berkel T.J.C., Breimer D.D., The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases, *Pharmacol. Rev.*, 49, 143-154, **1997**.

Di L., Kerns E.H., Hong Y., Chen H., Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery, *International Journal of Pharmaceutics*, 297, 110–119, **2005**.

Fagerholm U., The highly permeable blood–brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity, *Drug Discovery Today*, 12, 1076-1082, **2007**.

Fauci A.S., Braunwald E., Isselbacher K.J. et al., Principles of Internal Medicine. 14th Edition, McGrawHill, **1998**.

Fernandez C., Nieto O., Fontenla J.A., Rivas E., De Ceballos M.L., Fernandez-Mayoralas A., Synthesis of glycosyl derivatives as dopamine prodrugs: interaction with glucose carrier GLUT-1, *Org. Biomol. Hem.*, 1, 767-771, **2003**.

Fischer W., Praetor K., Metzner L., Neubert R.H.H., Brandsch M., Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: Mechanism and substrate specificity, *Biopharmaceutics*, 70, 486–492, **2008**.

Gennaro A.R., Remington. The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, Lippincott Williams and Wilkins, 1428, **2000**.

Giannola L.I., De Caro V., Avellone G., Bousquet E., L-pyroglutamyl-L-tryptophan derivatives as potential drug carriers part II, *Pharmazie*, 51, 487-489, **1996**.

Giannola L.I., Lamartina L., De Caro V., Synthesis and characterisation of aminoacidic pro-drugs of valproic acid, *Pharmazie*, 53, 829-834, **1998**.

Gibbs J.P., Adeyeye M.C., Yang Z., Shen D.D., Valproic acid uptake by bovine brain microvessel endothelial cells: role of active efflux transport, *Epilepsy Research*, 58, 53–66, **2004**.

Giraud M., Bernad N., Martinez J. and Cavelier F., New general strategy of dimerization of bioactive molecules, *Tetrahedron Letters*, 42 , 1895-1897, **2001**.

Goodman e Gilman's, Pharmacological Bases of Therapeutics, Mc Graw Hill, New York, 319-336, **2008**.

Habgood M.D., Begley D.J., Abbott N.J., Determinants of Passive Drug Entry into the Central Nervous System, *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20, 231-253, **2000**.

Isoherranen, N., Yagen, B., Bialer, M., New CNS-active drugs which are second generation valproic acid: can they lead to development of the magic bullet?, *Curr. Opin. Neurol.*, 16, 203–211, **2003**.

Isoherranen, N., Yagen, B., Blotnik, S., Spiegelstein, O., Wilcox, K.S., Woodhead, J.H., Finnell, R.H.,

White, H.S., Bialer, M., Characterization of the anticonvulsant activity and pharmacokinetics of propylisopropyl acetamide and its enantiomers, *Br. J. Pharmacol.*, 138, 602-613, **2003**.

Johannessen U., Mechanisms of action of valproate: a commentary, *Neurochemistry International*, 37, 103±110, **2000**.

Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Principi di Neuroscienze, Terza Edizione, Casa Editrice Ambrosiana, 897-923, **2007**.

Kwan P., Sills G.J., Brodie M.J., The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs, *Pharmacology & Therapeutics*, 90, 21-34, **2001**.

Lagace D.C., O'Brien W.T., Gurvich N., Nachtigal M.W., Klein P.S., 2004, Valproic acid: how it works or not, *Clinical Neuroscience Research*, 4, 215–225, **2004**.

Löscher W., Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action, *Progress in Neurobiology*, 58, 31±59, **1999**.

Löscher W., Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy, *CNS Drugs*, **2002**.

McLaughlin D.B., Eadie M.J., Parker-Scott S.L., Addison R.S., Henderson R.D., Hooper W.D., Dickinson R.G., Valproate metabolism during valproate-associated hepatotoxicity in a surviving adult patient, *Epilepsy Research*, 41, 259-268, **2000**.

Moffat A.C., Osselton M.D. and Widdop B., Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edition, Ed. Pharmaceutical Press, 1691-1692, **2004**.

Pajouhesh H. and Lenz G.R., Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System, *Drugs NeuroRx®*, 2, 541-553, **2005**.

Pardridge W.M., Non-invasive drug delivery to the human brain using endogenous blood brain barrier transport systems, *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2, 49-59, **1999**.

Pardridge W.M., Blood-brain barrier delivery, *Drug Discovery Today*, 12, 54-62, **2007**.

Pavan B., Dalpiaz A., Ciliberti N., Biondi C., Manfredini S. and Vertuani S., Progress in Drug Delivery to the Central Nervous System by the Prodrug Approach, *Molecules*, 13, 1035-1065, **2008**.

Perucca, E., The new antiepileptic drugs: pharmacological and clinical aspects, *Curr. Pharm. Des.*, 6, 839–860, **2000**.

Peterson G.M., Naunton M., Valproate: a simple chemical with so much to offer, *J. Clin.Pharm.Ther.*, 30, 417–421, **2005**.

Pitkanen A., Kharatishvili I., Karhunen H., Lukasiuk K., Immonen R., Nairismagi J., Grohn O., Nissinen J., Epileptogenesis in experimental models, *Epilepsia*, 48, 13-20, **2007**.

The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Edition, Ed. Merck & Co., Rahway N.J, **1996**.

Redecker C., Altrup U., Hoppe D., Duesing R., Speckmann E.J., Effects of valproate derivatives I. Antiepileptic efficacy of amides, structural analogs and esters, *Neuropharmacology*, 39, 254-266, **2000**.

Sardo P, Carletti F, D'Agostino S, Rizzo V, Ferraro G., Involvement of nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway in the control of maximal dentate gyrus activation in the rat, *J Neural Transm.*, 113, 1855-61, **2006**.

Sardo P and Ferraro G., Modulatory effects of nitric oxide-active drugs on the anticonvulsant activity of lamotrigine in an experimental model of partial complex epilepsy in the rat, *BMC Neurosci*, 8, 47-57, **2007**.

Shimshoni J.A., Bialer M., Wlodarczyk B., Finnell R.H., Yagen B., Potent Anticonvulsant Urea Derivatives of Constitutional Isomers of Valproic Acid, *J. Med. Chem.*, 50, 6419–6427, **2007**.

Shimshoni J.A., Bialer M., Yagen B., Synthesis and anticonvulsant activity of aromatictetramethylcyclopropanecarboxamide derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6297–6305, **2008**.

Slebioda M., Wodecki Z., Kolodziejczyk A.M., Formation of optically pure N-acyl-N,N'-dicyclohexylurea in N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide-mediated peptide synthesis, *Int. J. Pept. Protein. Res.*, 35, 539-541, **1990**.

Smith Q.R., Carrier-mediated transport to enhance drug delivery to brain, *International Congress Series*, 1277, 63-74, **2005**.

Sobol E., Yagen B., White H.S., Wilcox K.S., Lamb J.G., Pappo O., Wlodarczyk B.J., Finnell R.H., Bialer M., Preclinical evaluation of 2,2,3,3-tetramethylcyclopropanecarbonylurea, a novel, second generation to valproic acid, antiepileptic drug, *Neuropharmacology*, 51, 933-946, **2006**.

Sokolova S., Schmitz D., Zhang C.L., Löscher W., Heinemann U., Comparison of effects of valproate and trans-2-en-valproate on different forms of epileptiform activity in rat hippocampal and temporal cortex slices, *Epilepsia*, 39, 251-8, **1998**.

Spiegelstein O., Chatterjee N., Alexander G., Finnell R.H., Teratogenicity of valproate conjugates with anticonvulsant activity in mice, *Epilepsy Research*, 57, 145-152, **2003**.

Stella V. and Himmelstein K.J., Optimization of Drug Delivery, H. Bundgaard, A.B. Hansen, M. Koford (Eds), Munksgaard, Copenhagen, 134-155, **1982**.

Tasso S.M., Moon S.Ch., Bruno-Blancha L.E., Estiub G.L., Characterization of the anticonvulsant profile of valpromide derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 3857–3869, **2004**.

Temsamani J., Scherrmann J.M., Rees A.R., Kaczorek M., Brain drug delivery technologies: novel approaches for transporting therapeutics, *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 3, 155-162, **2000**.

Terasaki T. and Tsuji A., Drug delivery to the brain utilizing blood–brain barrier transport systems., *J. Control. Rel.*, 29, 163–169, **1994**.

Willoughby J., Mechanisms underlying partial (focal, or lesional) epilepsy, *J. Clin. Neurosci.*, 7, 291-294, **2000**.

Winkler I., Blotnik S., Shimshoni J., Yagen B., Devor M., Bialer M., Efficacy of antiepileptic isomers of valproic acid and valpromide in a rat model of neuropathic pain, *British Journal of Pharmacology*, 146, 198–208, **2005**.

Wolburg H. and Lippoldt A., Tight junctions of the blood brain-barrier: development, composition and regulation, *Vasc. Pharmacol.*, 38, 323-337, **2002**.

Wu P., Jiang L., Chen H.S., Sodium valproate at the therapeutic concentration inhibits the induction but not the maintenance phase of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area, *Biochemical and Biophysical Communications*, 391, 582-586, **2010**.

INDICE

Introduzione	pag. 3
Scopo della ricerca	pag. 18
Materiali e metodi	pag. 20
Risultati e discussione	pag. 37
Conclusioni	pag. 60
Ringraziamenti	pag. 62
Bibliografia	pag. 63